

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034767**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.18

(21) Номер заявки
201591771

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(54) **ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К БЕЛКУ F РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/782,215; 61/911,093**

(32) **2013.03.14; 2013.12.03**

(33) **US**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/US2014/025259**

(87) **WO 2014/159822 2014.10.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Гарнетт-Бандер Энн, Перес-
Кабальеро Давид, Сивапаласингам
Суматхи, Дуань Сюньбао, Макдоналд
Дуглас (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WU ET AL.: "Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 368, no. 3, 6 April 2007 (2007-04-06), pages 652-665, XP022020027, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2007.02.024, cited in the application, the whole document
US-A1-2003091584
US-B2-7635568

US-A-5824307
WO-A1-0151673
ARBIZA J. ET AL.: "CHARACTERIZATION OF TWO ANTIGENIC SITES RECOGNIZED BY NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE FUSION GLYCOPROTEIN OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 73, no. 9, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 2225-2234, XP002548166, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/0022-1317-73-9-2225

MCLELLAN JASON S. ET AL.: "Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab", NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 17, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), page 248, XP009133396, ISSN: 1072-8368, DOI: 10.1038/NSMB.1723 [retrieved on 2010-01-24]

K. A. SWANSON ET AL.: "Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 23, 7 June 2011 (2011-06-07), pages 9619-9624, XP055032519, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1106536108

WU SHENG-JIUN ET AL.: "Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 88, no. Part 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 2719-2723, XP002548168, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/VIR.0.82753-0

(57) В изобретении предложены полностью человеческие антитела, которые связываются с белком F респираторного синцитиального вируса, композиции, содержащие антитела, и способы применения. Антитела согласно изобретению применимы для предотвращения слияния вируса с клеточной мембраной и предотвращения распространения вируса от клетки к клетке и поэтому представляют собой средства для предотвращения инфекции или лечения пациента, страдающего

034767 B1

034767 B1

от инфекции, и облегчения одного или более симптомов или осложнений, связанных с вирусной инфекцией. Также антитела можно применять для диагностирования инфицирования РСВ.

034767 B1

034767 B1

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам человеческих антител, которые специфически связываются с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), составам, содержащим эти антитела, и способам применения этих антител.

Уровень техники

Респираторный синцитиальный вирус (РСВ) представляет собой отрицательно-полярный одноцепочечный РНК-вирус, который является основной причиной серьезных инфекций дыхательных путей у новорожденных и детей, при этом первичная инфекция возникает у детей возрастом от 6 недель до 2 лет и, редко, в первые 4 недели жизни во время нозокомиальных эпидемий (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300: 393-396). (Feigen et al., eds., 1987, *B: Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, W B Saunders, Philadelphia at pages 1653-1675; *New Vaccine Development, Establishing Priorities*, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington D.C. на стр. 397-409; Ruuskanen et al., 1993, *Curr. Probl. Pediatr.* 23:50-79; Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396). Некоторые группы детей находятся в зоне риска развития РСВ-инфекции, включая недоношенных новорожденных детей (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396), детей с врожденными пороками верхних дыхательных путей, детей с бронхопальмональной дисплазией (Groothuis et al., 1988, *Pediatrics* 82: 199-203), детей с врожденными пороками сердца (MacDonald et al., *New Engl. J. Med.* 307:397-400) и детей с врожденным или приобретенным иммунодефицитом (Ogra et al., 1988, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7: 246-249; и Pohl et al., 1992, *J. Infect. Dis.* 165:166-169) и муковисцидозом (Abman et al., 1988, *J. Pediatr.* 113: 826-830).

РСВ может также инфицировать взрослых людей. У этих людей РСВ приводит главным образом к заболеваниям верхних дыхательных путей, хотя для пожилых пациентов может существовать повышенный риск развития серьезной инфекции и воспаления легких (Evans, A. S., eds., 1989, *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3rd ed., Plenum Medical Book, New York на страницах 525-544), как и для взрослых людей после курса иммуносупрессивной терапии, в частности для пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга (Hertz et al., 1989, *Medicine* 68: 269-281).

Другие пациенты, находящиеся в зоне риска, включают пациентов с застойной сердечной недостаточностью и пациентов с хроническим обструктивным заболеванием легких (т.е. ХОЗЛ). Также сообщалось об эпидемиях среди пациентов домов для престарелых и помещенных в специальные лечебные учреждения людей молодого возраста (Falsey A. R., 1991, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12: 602-608; и Garvie et al., 1980, *Br. Med. J.* 281:1253-1254).

При том, что методы лечения развившегося РСВ-заболевания ограничены, более тяжелые формы заболевания нижних дыхательных путей часто требуют существенной поддерживающей терапии, включая подачу увлажненного кислорода и проведение искусственной вентиляции легких (Fields et. al, eds, 1990, *Fields Virology*, 2nd ed., vol. 1, Raven Press, New York на стр. 1045-1072).

Было показано, что рибавирин, который является единственным лекарственным препаратом, утвержденным для лечения инфекции, эффективен в лечении воспаления легких и бронхоолита, связанных с РСВ-инфекцией, и способен модифицировать течение тяжелого РСВ-заболевания в случае детей, не страдающих иммунодефицитом (Smith et al., 1991, *New Engl. J. Med.* 325:24-29). Применение рибавирина ограничено вследствие опасений, касающихся возможного риска для беременных женщин, которые могут принимать данный лекарственный препарат в виде аэрозоля в условиях стационара.

Аналогично, несмотря на то, что целесообразным могло бы стать применение вакцины, коммерчески доступной вакцины на сегодняшний день разработано не было. От нескольких кандидатных вакцин отказались, а остальные находятся на стадии разработки (Murphy et al, 1994, *Virus Res.* 32:13-36). Разработка вакцины оказалась проблематичной. В частности, понадобилась бы иммунизация в течение раннего неонатального периода, так как пик возникновения заболеваний нижних дыхательных путей приходится на возраст 2-5 месяцев. При этом известно, что в это время неонатальный иммунный ответ является незрелым. Плюс, новорожденные в это время имеют высокие титры материнских антител к РСВ, которые могут снижать иммуногенность вакцины (Murphy et al, 1988, *J. Virol.* 62:3907-3910; и Murphy et al., 1991, *Vaccine* 9: 185-189).

Было показано, что два гликопротеина - F и G - на поверхности РСВ являются мишенями нейтрализующих антител (Fields et al., 1990, выше; и Murphy et al., 1994, выше). Эти два белка отвечают главным образом за распознавание вируса и попадание в клетки-мишени; белок G связывается со специфическим клеточным рецептором, а белок F способствует слиянию вируса с клеткой. Также белок F экспрессируется на поверхности инфицированных клеток и отвечает за последующее слияние с другими клетками, что приводит к образованию синцития и распространению вируса от клетки к клетке.

На данный момент единственным утвержденным подходом для профилактики РСВ является пассивная иммунизация. Например, гуманизированное антитело паливизумаб (SYNAGIS®), являющееся специфическим в отношении эпитопа белка F, утверждено для внутримышечного введения педиатрическим пациентам для предотвращения вызванных РСВ тяжелых заболеваний нижних дыхательных путей в рекомендуемой месячной дозировке, составляющей 15 мг/кг массы тела, на протяжении всего сезона РСВ (с ноября по апрель для северного полушария). SYNAGIS® представляет собой композицию из последовательностей человеческих (95%) и мышинных (5%) антител. (Johnson et al., (1997), *J. Infect. Diseases*

176: 1215-1224 и патент США № 5824307).

Хотя SYNAGIS® успешно применяют для предотвращения РСВ-инфекции у педиатрических пациентов, для достижения профилактического эффекта необходимо многократное внутримышечное введение доз по 15 мг/кг SYNAGIS®. Необходимость многократного внутримышечного введения доз антител требует повторных визитов к врачу, что не только неудобно для пациента, но также может привести к пропускам некоторых доз.

Были предприняты попытки улучшить терапевтический профиль анти-PCB-F антитела и это привело к выявлению и разработке мотавизумаба, известного также как NUMAX™. Однако в ходе клинических исследований было обнаружено, что у некоторых пациентов, которым вводили мотавизумаб, проявлялись тяжелые аллергические реакции. Поэтому дальнейшая разработка этого гуманизированного анти-PCB-F антитела была прекращена.

Были описаны другие антитела к белку PCB-F, информацию о которых можно найти в US 6656467; US 5824307, US 7786273; US 7670600; US 7083784; US 6818216; US 7700735; US 7553489; US 7323172; US 7229619; US 7425618; US 7740851; US 7658921; US 7704505; US 7635568; US 6855493; US 6565849; US 7582297; US 7208162; US 7700720; US 6413771; US 5811524; US 6537809; US 5762905; US 7070786; US 7364742; US 7879329; US 7488477; US 7867497; US 5534411; US 6835372; US 7482024; US 7691603; US 8562996; US 8568726; US 20100015596; WO 2009088159 A1. На сегодняшний день ни одного препарата за исключением SYNAGIS® не было утверждено агентством по контролю для применения для предотвращения РСВ-инфекции.

Таким образом, до сих пор существует потребность в антителах, которые специфически связываются с антигеном PCB, таким как PCB-F, которые являются высокоэффективными и не вызывают нежелательных реакций, которые препятствовали бы их утверждению для клинического применения.

Сущность изобретения

В изобретении предложены полностью человеческие моноклональные антитела (mAb) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком F респираторного синцитиального вируса (PCB-F). Учитывая роль, которую белок F играет в слиянии вируса с клеткой и распространении вируса от клетки к клетке, описанные в данном документе антитела обеспечивают способ ингибирования этого процесса и, таким образом, их можно применять для предотвращения инфицирования пациента, предрасположенного к или находящегося в зоне риска приобретения РСВ-инфекции, или для лечения и/или облегчения одного или более симптомов, связанных с РСВ-инфекцией у пациента, предрасположенного к или находящегося в зоне риска приобретения РСВ-инфекции, или страдающего от РСВ-инфекции. Описанные в данном документе антитела также можно применять для предотвращения или для лечения РСВ-инфекции у пациента, у которого может развиться более тяжелая форма РСВ-инфекции вследствие наличия первопричинного или предсуществующего патологического состояния. Пациентом, которому лечение антителом согласно изобретению могло бы принести пользу, может быть недоношенный ребенок, доношенный ребенок, родившийся во время сезона РСВ (начиная приблизительно с поздней осени (ноябрь) до ранней весны (апрель)), который находится в зоне риска из-за наличия других предсуществующих или первопричинных патологических состояний, включая врожденный порок сердца или хроническое заболевание легких, ребенок старше одного года, имеющий или нет первопричинное патологическое состояние, помещенный в лечебное учреждение или госпитализированный пациент или пожилой человек (возрастом > 65 лет), имеющий или не имеющий первопричинное патологическое состояние, такое как застойная сердечная недостаточность (ЗСН) или хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ). Пациент, которому такая терапия могла бы принести пользу, может страдать от патологического состояния в результате нарушения легочной, сердечно-сосудистой, нервно-мышечной или иммунной системы. Например, пациент может страдать патологией дыхательных путей или нарушением функции дыхательных путей, хроническим заболеванием легких, хроническим или врожденным заболеванием сердца, нервно-мышечным заболеванием, которое приводит к нарушению управления секрецией из органов дыхания, или у пациента может быть ослаблен иммунитет вследствие наличия тяжелого комбинированного иммунодефицита или тяжелого приобретенного иммунодефицита, или у пациента может быть ослаблен иммунитет вследствие лечения иммуносупрессорными лекарственными препаратами (например, любыми препаратами, применяемыми при лечении перенесших трансплантацию пациентов) или лучевой терапии. Пациент, которому антитела согласно изобретению могут принести пользу, может быть пациентом, страдающим от хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), муковисцидоза (МВ), бронхопульмональной дисплазии, застойной сердечной недостаточности (ЗСН) или врожденного порока сердца.

Из-за того, что антитела согласно изобретению более эффективно нейтрализуют РСВ по сравнению с известными антителами, для достижения более высокого уровня защиты от инфицирования РСВ и более эффективного лечения и/или облегчения симптомов, связанных с РСВ-инфекцией, можно применять более низкие дозы антител или фрагментов антител. Соответственно, результатом применения более низких доз антител или их фрагментов, которые иммуноспецифически связываются с антигеном PCB-F, может стать меньшее количество или меньшая степень тяжести нежелательных явлений. Аналогично,

результатом применения более эффективных нейтрализующих антител может стать снижение потребности в частом введении антител или фрагментов антител, которое раньше считалось необходимым для предотвращения инфекции или для нейтрализации вируса, или для лечения или облегчения одного или более симптомов, связанных с РСВ-инфекцией. Симптомы РСВ-инфекции могут включать синеватый оттенок кожи вследствие недостатка кислорода (гипоксия), затруднение дыхания (учащенное дыхание или нехватку дыхания), кашель, непреодолимый кашель ("лающий" кашель), высокую температуру, раздувание крыльев носа, заложенность носа (забитый нос), апноэ, снижение аппетита, обезвоживание, плохое питание, изменение психического состояния или свистящее дыхание.

Такие антитела могут быть полезны при профилактическом применении (до контакта с вирусом и инфицирования вирусом) для снижения тяжести или длительности первичного инфицирования РСВ, или облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией. Антитела можно применять сами по себе или в совокупности со вторым агентом, применяемым для лечения РСВ-инфекции. В определенных вариантах реализации изобретения антитела можно применять терапевтически (после контакта с и инфицирования вирусом), как сами по себе, так и в совокупности со вторым агентом для снижения тяжести или длительности первичного инфицирования или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией. В определенных вариантах реализации изобретения антитела можно применять профилактически в качестве самостоятельной терапии для защиты пациентов, которые подвержены риску приобретения РСВ-инфекции, таких как те, которые были описаны выше. Любой из этих групп пациентов лечение антителами согласно изобретению может принести пользу, как при отдельном применении, так и в совокупности со вторым агентом, включая, например, противовирусную терапию, осуществляемую при помощи рибавирина или других противовирусных вакцин.

Антитела согласно изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv), а также могут быть модифицированными для изменения функциональности, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., (2000), J. Immunol. 164: 1925-1933).

Соответственно в первом аспекте в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F).

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), при этом антитело обладает одной или более из следующих характеристик:

- (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- (b) взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354;
- (c) взаимодействует с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354;
- (d) способно нейтрализовать штаммы респираторного синцитиального вируса подтипа А и подтипа В *in vitro*;
- (e) демонстрирует способность существенно снижать назальную и/или легочную вирусную нагрузку *in vivo* в животной модели РСВ-инфекции; или
- (f) ингибирует слияние вируса с клеткой.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), при этом антитело взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354, и нейтрализует штаммы респираторного синцитиального вируса подтипа А и/или подтипа В *in vitro* и *in vivo*.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует способность существенно снижать легочную вирусную нагрузку в мышинной модели РСВ-инфекции при применении в дозировке в диапазоне от около 0,05 до около 0,15 мг/кг.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует в 1-2 раза

большее логарифмическое снижение назальных и/или легочных вирусных титров по сравнению с паливизумабом в модели РСВ-инфекции с хлопковыми хомяками при применении в дозировке в диапазоне от около 0,62 до около 5,0 мг/кг.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует ED₉₉, составляющую около 0,15 мг/кг или менее при применении в мышинной модели РСВ-инфекции подтипа А.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует ED₉₉, составляющую около 0,62 мг/кг или менее при применении в модели РСВ-инфекции подтипа А с хлопковыми хомяками.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует ED₉₉, составляющую около 2,5 мг/кг или менее при применении в модели РСВ-инфекции подтипа В с хлопковыми хомяками.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), демонстрирует ED₉₉, приблизительно в 2-3 раза ниже, чем ED₉₉ для паливизумаба или мотавизумаба.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), демонстрирует концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀), составляющую от около 2 до около 600 пМ в анализе микронеutralизации, специфическом в отношении штаммов РСВ подтипа А.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), демонстрирует концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀), составляющую от около 6 до около 100 пМ в анализе микронеutralизации, специфическом в отношении штаммов РСВ подтипа В.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком РСВ-F, демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 15-17 раз улучшена по сравнению с паливизумабом, или демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более клинических штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 10-22 раза улучшена по сравнению с паливизумабом.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа В, которая приблизительно в 2-5 раз улучшена по сравнению с паливизумабом.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа А или клинических штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 0,5-2 раза улучшена по сравнению с АМ-22.

В одном варианте реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа В, которая приблизительно в 2,5-17 раз улучшена по сравнению с АМ-22.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), при проведении измерений методом поверхностного плазмонного резонанса демонстрирует K_d в диапазоне от 1 × 10⁻⁷ до 6 × 10⁻¹⁰ М.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), при проведении измерений методом поверхностного плазмонного резонанса демонстрирует K_d в диапазоне от 1 × 10⁻⁷ до 9 × 10⁻⁹ М.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и 338; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последователь-

ности LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346.

Методы и способы определения CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут применяться для определения CDR в пределах раскрытых в данном документе определенных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR. Типовые подходы, которые можно применять для определения границ CDR, включают, например, определение Кабата, определение Хотиа и определение AbM. В общих чертах, определение Кабата основано на вариабельности последовательностей, определение Хотиа основано на расположении областей структурных петель, а определение AbM является компромиссом между подходами Кабата и Хотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et. al, (1997), J. Mol. Biol. 273:927-948; и Martin et al, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272. Также для определения последовательностей CDR в пределах антитела доступны публичные базы данных.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и 338.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и 338; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит вариабельную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 363 и вариабельную область легкой цепи из SEQ ID NO: 364.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 и 338/346.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 274/282 и 338/346.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит:

(а) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328 и 344; и

(b) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 и 352.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), дополнительно содержит:

(с) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 и 340;

(d) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 и 342;

(е) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 и 348; и

(ф) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 и 350.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит:

(а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 и 340;

(б) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 и 342;

(с) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328 и 344;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 и 348;

(е) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 и 350; и

(ф) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 и 352.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), содержит:

(а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 276 и 340;

(б) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 278 и 342;

(с) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 280 и 344;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 284 и 348;

(е) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 286 и 350; и

(ф) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 288 и 352.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCV-F, содержит аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 276, 278 и 280 соответственно, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 284, 286 и 288 соответственно.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCV-F, содержит аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 340, 342 и 344 соответственно, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 348, 350 и 352 соответственно.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCV-F), конкурирует за специфическое связывание с PCV-F с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим пары последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 и 338/346.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит пары последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 и 338/346, и которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса

(PCB-F), не конкурирует за специфическое связывание с PCB-F с паливизумабом, мотавизумабом или АМ-22.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCB-F), связывается с тем же самым эпитопом PCB-F, который распознается антителом, содержащим пары последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 и 338/346.

В одном варианте реализации изобретения выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит пары последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 и 338/346, и которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCB-F), не связывается с тем же самым эпитопом PCB-F, что и паливизумаб или мотавизумаб.

В одном варианте реализации в изобретении предложено полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCB-F, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует одну из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и 338 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328 и 344 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 и 352 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 и 340 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (v) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 и 342 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (vi) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 и 348 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (vii) и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 и 350 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (viii) демонстрирует K_d в диапазоне от около 1×10^{-7} до около 6×10^{-10} М, измеренную методом поверхностного плазмонного резонанса; (ix) способно нейтрализовать штаммы респираторного синцитиального вируса подтипа А и/или подтипа В *in vitro*; (x) демонстрирует способность существенно снижать вирусную нагрузку в мышинной модели PCB-инфекции при применении в дозировке в диапазоне от около 0,05 до около 0,15 мг/кг; (xi) демонстрирует в 1-2 раза большее логарифмическое снижение назальных и/или легочных вирусных титров у хлопковых хомяков в модели PCB-инфекции при применении в дозировке в диапазоне от около 0,62 до около 5,0 мг/кг при сравнении с паливизумабом; (xii) демонстрирует эффективную дозу 99 (ED₉₉) в диапазоне от около 0,15 до около 2,5 мг/кг при применении в животной модели PCB-инфекции (например, мышинной модели или модели с хлопковыми хомяками); или (xiii) демонстрирует концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀), составляющую от около 2 до около 15 пМ в анализе микронеutralизации, специфическом в отношении штаммов PCB подтипа А, и концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀), составляющую от около

6 до около 100 пМ в анализе микронеutralизации.

В одном варианте реализации в изобретении предложено полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с РСВ-F, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует одну из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и 338 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328 и 344 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 и 352 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 и 340 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (v) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 и 342 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (vi) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 и 348 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (vii) и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 и 350 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (viii) демонстрирует K_d в диапазоне от около 1×10^{-7} до около 6×10^{-10} М; (ix) способно нейтрализовать штаммы респираторного синцициального вируса подтипа А и/или подтипа В *in vitro*; (x) демонстрирует способность существенно снижать вирусную нагрузку в животной модели РСВ-инфекции (например, мышинной модели) при применении в дозировке в диапазоне от около 0,05 мг/кг до около 0,15 мг/кг; (xi) демонстрирует в 1-2 раза большее логарифмическое снижение назальных и/или легочных вирусных титров в животной модели РСВ-инфекции (например, модели с хлопковыми хомяками) при дозировке в диапазоне от около 0,62 до около 5,0 мг/кг при сравнении с паливизумабом; (xii) демонстрирует эффективную дозу 99 (ED₉₉) в диапазоне от около 0,05 до около 2,5 мг/кг при применении в животной модели РСВ-инфекции (например, мышинной модели или модели с хлопковыми хомяками); (xiii) демонстрирует ED₉₉ приблизительно в 2-3 раза ниже, чем ED₉₉ для паливизумаба или мотавизумаба; (xiv) демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 15-17 раз улучшена по сравнению с паливизумабом, или демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более клинических штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 10-22 раза улучшена по сравнению с паливизумабом; (xv) демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа В, которая приблизительно в 2-5 раз улучшена по сравнению с паливизумабом; (xvi) демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа А или одного или более клинических штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 0,5-2 раза улучшена по сравнению с АМ-22; (xvii) демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа В, которая приблизительно в 2,5-17 раз улучшена по сравнению с АМ-22.

В одном варианте реализации в изобретении предложено полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с РСВ-F, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует одну из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и

338 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328 и 344 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 и 352 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 и 340 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (v) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 и 342 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (vi) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 и 348 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (vii) и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 и 350 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (viii) демонстрирует K_d в диапазоне от около 1×10^{-7} до около 6×10^{-10} М; (ix) способно нейтрализовать штаммы респираторного синцитиального вируса подтипа А и/или подтипа В *in vitro*; (x) демонстрирует способность существенно снижать вирусную нагрузку у млекопитающего, пораженного РСВ-инфекцией; (xi) взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354; (xii) взаимодействует с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354; (xiii) ингибирует слияние РСВ с клеткой-хозяином; (xiv) перекрестно не конкурирует с паливизумабом или AM-22 за связывание РСВ-F.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (РСВ-F), или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355 и 356.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах остатков от 161 до 188 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах SEQ ID NO: 355 или SEQ ID NO: 356.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCB-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354, и при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) из SEQ ID NO: 274; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) из SEQ ID NO: 282.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCB-F), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) домен HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 276;
- (b) домен HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 278;
- (c) домен HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 280;
- (d) домен LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 284;
- (e) домен LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 286; и
- (f) домен LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 288.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCB-F, при этом антитело содержит три HCDR, которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) из SEQ ID NO: 274; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) из SEQ ID NO: 282, а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355 и 356.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCB-F, при этом антитело содержит три HCDR, которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) из SEQ ID NO: 274; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) из SEQ ID NO: 282, а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах остатков от 161 до 188 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCB-F, при этом антитело содержит три HCDR, которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) из SEQ ID NO: 274; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) из SEQ ID NO: 282, а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах SEQ ID NO: 355 или SEQ ID NO: 356.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PCB-F, при этом антитело содержит три HCDR, которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) из SEQ ID NO: 274; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) из SEQ ID NO: 282, а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое перекрестно не конкурирует с паливизумабом или мотавизумабом за связывание PCB-F.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое перекрестно не конкурирует с AM-22 за связывание PCB-F.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое не связывает такой же самый эпитоп PCB-F, что и паливизумаб.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое не связывает такой же самый эпитоп PCB-F, что и мотави-

зумаб.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое не связывается с эпитопом РСВ-F в диапазоне приблизительно от аминокислотного остатка 255 приблизительно до аминокислотного остатка 276 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое не связывается с тем же самым эпитопом РСВ-F, что и паливизумаб, при этом эпитоп находится в диапазоне приблизительно от аминокислотного остатка 255 приблизительно до аминокислотного остатка 276 из SEQ ID NO: 354.

Во втором аспекте в изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с РСВ-F. Также в изобретение включены рекомбинантные экспрессионные векторы, несущие нуклеиновые кислоты согласно изобретению, и клетки-хозяева, в которые были внесены такие векторы, а также способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, способствующих выработке антител, и восстановления полученных антител.

В одном варианте реализации в изобретении предложено антитело или его фрагмент, содержащее HCVR, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321 и 337 или в значительной степени идентичной последовательностью, имеющей с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии.

В одном варианте реализации изобретения HCVR кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 273 и 337.

В одном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент дополнительно содержит LCVR, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329 и 345 или в значительной степени идентичной последовательностью, имеющей с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии.

В одном варианте реализации изобретения LCVR кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 281 и 345.

В одном варианте реализации в изобретении также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, содержащее домен HCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 327 и 343 или в значительной степени сходной с ними последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен LCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 335 и 351 или в значительной степени сходной с ними последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В одном варианте реализации в изобретении предложено антитело или его фрагмент, дополнительно содержащее домен HCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 323 и 339 или в значительной степени сходной с ними последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен HCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 325 и 341 или в значительной степени сходной с ними последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен LCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 331 и 347 или в значительной степени сходной с ними последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен LCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 333 и 349 или в значительной степени сходной с ними последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

В третьем аспекте в изобретении представлено человеческое антитело или его антигенсвязывающий домен, специфическое в отношении РСВ-F, содержащее HCVR, кодируемую сегментами нуклеотидной последовательности, полученными из последовательностей V_H, D_H и J_H зародышевой линии, и LCVR, кодируемую сегментами нуклеотидной последовательности, полученными из последовательностей V_K и J_K зародышевой линии.

В изобретение включены антитела, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых применениях может быть целесообразным проведение модификаций для удаления нежелательных участков гликозилирования или, например, удаление фукозного компонента для повышения антитело-зависимой функции клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см., Shield et al. (2002) JBC 277: 26733). В других применениях можно проводить модификацию галактозилирования, чтобы модифицировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ).

В четвертом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с РСВ-F, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В одном варианте реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая два полностью человеческих моноклональных антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с одним и тем же эпитопом или связываются с двумя разными эпитопами РСВ-F, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Следует понимать, что в фармацевтической композиции можно применять любую комбинацию описанных в данном документе антител для того, чтобы достичь желаемых результатов в группе пациентов, нуждающихся в такой терапии. Например, в композиции можно применять два антитела, которые распознают и/или связывают РСВ-F. В альтернативном варианте в композиции можно применять два антитела, одно из которых распознает и/или связывает РСВ-F, а второе связывается с другим антигеном на РСВ (например, РСВ-G). В одном варианте реализации изобретения в композиции можно применять два антитела, одно из которых распознает и/или связывают РСВ-F, а второе связывается с антигеном метапневмовируса. В альтернативном варианте в композиции можно применять два или более антител, одно из которых распознает и/или связывают РСВ-F, одно связывается с антигеном метапневмовируса, а одно связывается с антигеном вируса гриппа или любого другого вируса, который вызывает респираторные заболевания.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело, которое связывается с РСВ-F и содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 274/282 и 338/346.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело, которое связывается с РСВ-F и содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, состоящую из SEQ ID NO: 274/282.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело, которое связывается с РСВ-F и содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, состоящую из SEQ ID NO: 338/346.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антитело, которое связывает РСВ-F, при этом антитело содержит три определяющих комплементарности области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), которые находятся в пределах любой из аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 274 и 338; и три определяющих комплементарности области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в пределах любой из аминокислотных последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 282 и 346.

В одном варианте реализации изобретения антитела согласно изобретению или композиции, содержащие одно или более антител согласно изобретению, можно применять для нейтрализации РСВ из любого штамма РСВ подтипа А или подтипа В.

В одном варианте реализации в изобретении представлена композиция, которая представляет собой комбинацию антитела и антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно изобретению и второго терапевтического агента.

Второй терапевтический агент может представлять собой низкомолекулярный лекарственный препарат, белок/полипептид, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, такую как антисмысловая молекула, или миРНК. Второй терапевтический агент может быть получен синтетическим или природным путем.

Второй терапевтический агент может представлять собой любой агент, который целесообразно комбинировать с антителом или его фрагментом согласно изобретению, например противовирусный агент (например, рибавирин), специфическую в отношении РСВ вакцину или вакцину, специфическую в отношении вируса гриппа, или вакцину, специфическую в отношении метапневмовируса (МПВ), специфическую в отношении антигена РСВ миРНК, специфическую в отношении антигена вируса гриппа миРНК, специфическую в отношении антигена метапневмовируса (МПВ) миРНК, второе антитело, специфическое в отношении антигена РСВ или антигена метапневмовируса (МПВ), или антигена вируса гриппа, анти-IL4R антитело, анти-РСВ-G антитело или НПВП. В определенных вариантах реализации изобретения второй терапевтический агент может представлять собой агент, который помогает противодействовать или уменьшает любые возможные побочные явления, связанные с антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела согласно изобретению, в случае, когда могут возникать такие побочные явления.

Также следует понимать, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции согласно на-

стоящему изобретению можно применять в комбинированной терапии, что означает, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции можно вводить параллельно с, до или после одного или более других необходимых терапевтических средств или медицинских процедур. Конкретная комбинация видов терапии (терапевтических средств или процедур) для применения в комбинированном режиме должна учитывать совместимость необходимых терапевтических средств и/или процедур и желаемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. Также следует понимать, что применяемые виды терапии могут приводить к желаемому эффекту в случае одного и того же нарушения (например, антитело можно вводить параллельно с другим агентом, применяемым для лечения того же нарушения) или они могут приводить к разным эффектам (например, к контролю любых неблагоприятных эффектов). В контексте данного документа дополнительные терапевтические агенты, которые обычно вводят для лечения или предотвращения конкретного заболевания или патологического состояния, соответствуют заболеванию или патологическому состоянию, лечение которого проводят.

При совместном введении нескольких терапевтических средств дозировки можно корректировать в соответствии с общепринятыми в данной области техники принципами.

В пятом аспекте в изобретении предложен способ предотвращения инфицирования респираторным синцитиальным вирусом нуждающегося в этом пациента или лечения пациента, страдающего от инфицирования РСВ, или облегчения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с РСВ-инфекцией, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту одного или более описанных в данном документе антител или их антигенсвязывающих фрагментов или фармацевтической композиции, содержащей одно или более описанных в данном документе антител согласно изобретению или их фрагментов, таким образом, что происходит предотвращение РСВ-инфекции или облегчение, смягчение, снижение тяжести и/или продолжительности по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией.

В родственном варианте реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более антител согласно изобретению, как одних, так и в комбинации со вторым терапевтическим агентом, для применения в предотвращении инфекции, вызванной респираторным синцитиальным вирусом (РСВ), у нуждающегося в этом пациента или для лечения пациента, страдающего от РСВ-инфекции, или для облегчения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией, при этом происходит предотвращение инфекции или предотвращение, облегчение или уменьшение тяжести и/или продолжительности по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией.

В одном варианте реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более антител согласно изобретению, как одних, так и в комбинации со вторым терапевтическим агентом, для применения в производстве медикамента для предотвращения инфекции, вызванной респираторным синцитиальным вирусом (РСВ), у нуждающегося в этом пациента или для лечения пациента, страдающего от РСВ-инфекции, или для облегчения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией, при этом происходит предотвращение инфекции или предотвращение, облегчение или уменьшение тяжести и/или продолжительности по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией.

В одном варианте реализации изобретения пациент, нуждающийся в лечении антителом согласно изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой пациента, у которого может развиваться более тяжелая форма РСВ-инфекции вследствие наличия первопричинного или предшествующего патологического состояния. В одном варианте реализации в изобретении предложен способ предотвращения развития РСВ-инфекции у пациента, находящегося в зоне риска, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с белком F РСВ, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с белком F РСВ, таким образом, что происходит предотвращение, облегчение или уменьшение тяжести и/или продолжительности инфекции или предотвращение, облегчение или уменьшение тяжести или продолжительности по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией. В одном варианте реализации изобретения введение выделенного человеческого антитела к РСВ-F или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к предотвращению у пациента рецидивирующей бронхиальной обструкции. В одном варианте реализации изобретения введение выделенного человеческого антитела к РСВ-F или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к предотвращению у ребенка связанной с РСВ астмы. В одном варианте реализации изобретения введение выделенного человеческого антитела к РСВ-F или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к предотвращению РСВ-инфекции, вызываемой респираторным синцитиальным вирусом подтипа А или подтипа В.

В одном варианте реализации изобретения по меньшей мере один симптом или осложнение, связанный с РСВ-инфекцией, который можно лечить при помощи антитела согласно изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть выбран из группы, состоящей из гипоксии, синеватого оттенка кожи вследствие недостатка кислорода, затруднения дыхания (например, учащенного дыхания или нехватки дыхания), кашля, непреодолимого кашля ("лающего" кашля), высокой температуры, разду-

вания крыльев носа, заложенности носа, свистящего дыхания, воспаления легких, апноэ, обезвоживания, плохого питания, изменения психического состояния, снижения аппетита или бронхолита.

В одном варианте реализации изобретения пациент, подверженный риску развития РСВ-инфекции, которому лечение антителами согласно изобретению или композицией, содержащей одно или более антител согласно изобретению, могло бы принести пользу, может быть выбран из группы, состоящей из недоношенного ребенка, доношенного ребенка, который ослаблен вследствие какого-либо другого первопричинного патологического состояния и/или был рожден в пик сезона РСВ, ребенка старше или в возрасте одного года, имеющего или нет первопричинное патологическое состояние (например, врожденный порок сердца, хроническое заболевание легких, муковисцидоз, иммунодефицит, нервно-мышечное нарушение), помещенного в лечебное учреждение или госпитализированного пациента, пожилого человека (возрастом ≥ 65 лет), имеющего или нет первопричинное патологическое состояние, такое как застойная сердечная недостаточность и хроническое обструктивное заболевание легких, пациента с ослабленным иммунитетом вследствие первопричинного заболевания или вследствие применения иммуносупрессорных терапевтических средств, пациента, у которого есть какое-либо первопричинное патологическое состояние, которое может предрасположить его к инфицированию РСВ, например, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), застойная сердечная недостаточность, муковисцидоз, бронхопульмональная дисплазия, нарушение функции дыхательных путей, хроническое заболевание легких, ракового пациента или перенесшего трансплантацию пациента, который проходит иммуносупрессорную терапию.

В одном варианте реализации изобретения пациент, являющийся кандидатом для применения терапии антителом согласно изобретению, может страдать от патологического состояния в результате нарушений легочной, сердечно-сосудистой, нервно-мышечной или иммунной системы. Патологическое состояние может быть выбрано из группы, состоящей из патологии дыхательных путей, хронического заболевания легких, хронического заболевания сердца, нервно-мышечного заболевания, которое приводит к нарушению управления секрецией из органов дыхания, и иммуносупрессии. Хроническое заболевание легких может представлять собой хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), муковисцидоз или бронхопульмональную дисплазию. Хроническое заболевание сердца может представлять собой застойную сердечную недостаточность (ЗСН) или врожденный порок сердца. Нервно-мышечное заболевание или патологическое состояние может представлять собой нейродегенеративное заболевание или неспособность управлять и/или избавляться от продуктов секреции из органов дыхания вследствие повреждения или острого нарушения нервной системы, например инсульта или повреждения спинного мозга. Иммуносупрессия может быть следствием тяжелого комбинированного иммунодефицита или тяжелого приобретенного иммунодефицита, или может быть следствием любого другого инфекционного заболевания или ракового заболевания, которое приводит к ослаблению иммунитета, или является следствием лечения иммуносупрессорными лекарственными препаратами или лучевой терапии.

В одном варианте реализации изобретения антитело в профилактических целях вводят (до развития инфекции) пациенту, находящемуся в зоне риска развития РСВ-инфекции или риска развития по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с РСВ-инфекцией. Пациентам, являющимся кандидатами для применения терапии антителами согласно изобретению, можно вводить композицию, содержащую одно или более антител, любым путем, подходящим для введения, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию или подкожную инъекцию.

В одном варианте реализации изобретения антитело в терапевтических целях вводят (после развития инфекции) пациенту для облегчения или снижения тяжести и/или продолжительности по меньшей мере одного симптома, связанного с РСВ-инфекцией.

В одном варианте реализации изобретения антитела согласно изобретению можно вводить пациенту в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, применяемыми для лечения РСВ-инфекции. Один или более терапевтические агенты могут быть выбраны из группы, состоящей из противовирусного агента; вакцины, специфической в отношении РСВ, вакцины, специфической в отношении вируса гриппа, или вакцины, специфической в отношении метапневмовируса (МПВ); мРНК, специфической в отношении антигена РСВ или антигена метапневмовируса (МПВ); второго антитела, специфического в отношении антигена РСВ или антигена метапневмовируса (МПВ); анти-IL4R антитела, антитела, специфического в отношении антигена вируса гриппа, анти-РСВ-G антитела или НПВП.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - схематическое изображение белка РСВ-F;

Фиг. 2А и 2В - демонстрирует, что Н1Н3592Р3 блокирует попадание вируса внутрь клетки путем ингибирования слияния вируса и клеточных мембран.

Подробное описание изобретения

Перед описанием настоящих способов следует принять, что это изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе в целях описания конкретных вариантов реализации изобретения, не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в той области техники, к которой относится это изобретение. При употреблении в данном документе термин "около" в отношении конкретного числового значения означает, что это значение может изменяться относительно указанного значения не более чем на 1%. Например, при употреблении в данном документе термин "около 100" включает в себя 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Несмотря на то, что при практической реализации или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные или эквивалентные с теми, которые описаны в данном документе, предпочтительные способы и материалы будут описаны ниже.

Определения

"Белок F респираторного синцитиального вируса" также называемый "PCB-F" представляет собой трансмембранный поверхностный белок типа I, который содержит N-терминальный отщепляемый сигнальный пептид и мембранный якорь вблизи C-конца (Collins, P.L. et al, (1984), PNAS (USA) 81:7683-7687). Белок PCB-F синтезируется в виде неактивного 67 кДа предшественника, обозначаемого F0 (Calder L. J.; et al., Virology (2000), 277, 122-131. Белок F0 протеолитически активируется в комплексе Гольджи фурин-подобной протеазой на двух участках, что приводит к получению двух дисульфидно связанных полипептидов - F2 и F1 - из N- и C-конца соответственно. Происходит высвобождение 27-аминокислотного пептида, называемого "pep27". На каждой стороне pep27 есть фурин-расщепляемые участки (ФРУ) (Collins P.L.; Mottet G. (1991), J.Gen. Virol, 72: 3095-3101; Sugrue R. J, et al. (2001), J. Gen.Virol, 82, 1375-1386). Субъединица F2 состоит из группы из семи повторов С (HRC), в то время как F1 содержит слитый полипептид (FP), группу из семи повторов А (HRA), домен I, домен II, группу из семи повторов В (HRB), трансмембранный (TM) и цитоплазматический домен (CP) (См. Sun Z. et al. Virology (2013), 5: 211-225). Белок PCB-F играет роль в слиянии вирусной частицы с клеточной мембраной и экспрессируется на поверхности инфицированной клетки, таким образом, играя роль в распространении вируса от клетки к клетке и образовании синцития. Аминокислотная последовательность белка PCB-F представлена в GenBank под номером доступа AAX23994 и также называется в данном документе SEQ ID NO: 354.

Генетически сконструированная конструкция белка PCB-F приведена в данном документе в виде аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 353.

Употребляемый в данном документе термин "лабораторный штамм" относится к штамму PCB (подтипа А или В), который прошел широкомасштабное *in vitro* клеточное культивирование. "Лабораторный штамм" может содержать адаптивные мутации, которые могут влиять на его биологические свойства. Употребляемый в данном документе термин "клинический штамм" относится к изоляту PCB (подтипа А или В), который получен от неинфицированного индивида и который был выделен и выращен в тканевой культуре с небольшим количеством пассажей.

Термин "эффективная доза 99" или "ED₉₉" относится к дозировке агента, которая обеспечивает желаемый эффект, состоящий в 99% снижении образования вирусных бляшек по сравнению с изотипическим (отрицательным) контролем. В настоящем изобретении ED₉₉ относится к дозировке анти-PCB-F антител, которая приводит к нейтрализации вирусной инфекции (например, снижению 99% вирусной нагрузки) *in vivo*, как описано в примере 5.

Термин "IC50" относится к "концентрации полумаксимального ингибирования", величина которой определяет эффективность ингибирования соединением (например, анти-PCB-F антителом) биологической или биохимической функции. Этот количественный показатель определяет количество, требуемое в случае конкретного ингибитора для ингибирования заданного биологического процесса наполовину.

"Паливизумаб" также называемый "SYNAGIS®" представляет собой анти-PCB-F антитело с вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющими аминокислотные последовательности, приведенные в US7635568 и 5824307 (также приведенные в данном документе в виде SEQ ID NO: 361 для тяжелой цепи антитела и SEQ ID NO: 362 для легкой цепи антитела). Это антитело, которое иммуноспецифически связывается с белком PCB-F, на сегодняшний день утверждено FDA как средство для пассивной иммунопрофилактики серьезных PCB-заболеваний у подверженных высокому риску детей и вводится внутримышечно в рекомендуемой месячной дозировке, составляющей 15 мг/кг массы тела на протяжении сезона PCB (с ноября по апрель в северном полушарии). SYNAGIS® состоит из 95% человеческих и 5% мышинных последовательностей антитела. Смотрите также Johnson et al., (1997), J. Infect. Diseases 176: 1215-1224.

"Мотавизумаб", также называемый "NUMAX™", представляет собой PCB-F-специфическое гуманизированное моноклональное антитело с повышенной эффективностью, полученное путем *in vitro* созревания аффинности определяющих комплементарность областей тяжелой и легкой цепей паливизумаба. В качестве справочной информации аминокислотная последовательность антитела NUMAX™ раскрыта в патентной публикации США 2003/0091584 и в патенте США № 6818216 и в Wu et al, (2005) J. Mol. Bio. 350(1): 126-144 и в Wu et al. (2007) J. Mol. Biol. 368:652-665. Она также приведена в данном документе в виде SEQ ID NO: 359 для тяжелой цепи антитела и SEQ ID NO: 360 для легкой цепи антите-

ла.

Употребляемые в данном документе термины "лечить" и "лечение" относятся к снижению или облегчению прогрессирования, тяжести и/или продолжительности РСВ-инфекции верхних и/или нижних дыхательных путей, среднего отита или связанного с ними симптома респираторного патологического состояния (такого как астма, свистящее дыхание или их комбинация) в результате применения одного или более видов терапии (включая, но не ограничиваясь этим, введение одного или более профилактических или терапевтических агентов). В конкретных вариантах реализации изобретения эти термины относятся к снижению или ингибированию репликации РСВ, ингибированию или снижению распространения РСВ на другие ткани или субъектов (например, распространение в нижние дыхательные пути), ингибированию или снижению инфицирования клетки РСВ или облегчение одного или более симптомов, связанных с РСВ-инфекцией верхних и/или нижних дыхательных путей или средним отитом.

Употребляемые в данном документе термины "предотвращать" и "предотвращение" относятся к предотвращению или ингибированию развития или начала РСВ-инфекции верхних и/или нижних дыхательных путей, среднего отита или связанного с ними симптома респираторного патологического состояния у субъекта, предотвращению или ингибированию прогрессирования РСВ-инфекции верхних дыхательных путей или РСВ-инфекции нижних дыхательных путей, среднего отита или связанного с ними симптома респираторного патологического состояния в результате применения терапии (например, профилактическим или терапевтическим агентом), предотвращению симптома РСВ-инфекции верхних и/или нижних дыхательных путей, среднего отита или связанного с ними симптома респираторного патологического состояния, или применению комбинации разных видов терапии (например, комбинации профилактических или терапевтических агентов).

Употребляемый в данном документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей, - соединенных дисульфидными связями (т.е. "полным молекулам антител"), а также к их мультимерам (например, IgM) или антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, выстроенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах реализации изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям человеческой зародышевой линии или могут быть модифицированы природным или искусственным путем. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или более CDR.

Также возможно замещение одного или более остатков CDR или исключение одной или более CDR. В научной литературе были описаны антитела, в которых в целях связывания могут быть удалены одна или две CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проводил анализ областей контакта между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и заключил, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или более CDR не содержат аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно определить на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не нужны), из CDR-областей по Кабату, лежащих за пределами CDR-областей по Хотиа, при помощи молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. В случае, если CDR или ее остаток(ки) исключены, они обычно замещены аминокислотой, занимающей соответствующую позицию в другой человеческой последовательности антитела или консенсусным вариантом этих последовательностей. Позиции для замещения в пределах CDR и аминокислоты, на которые производится замена, также можно выбрать эмпирическим путем. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

Описанные в данном документе полностью человеческие моноклональные антитела могут содержать одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко определить путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из публичных баз данных по последовательностям антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей, при этом одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных и/или CDR-областей мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или до консервативной

аминокислотной замены соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (все такие изменения последовательностей в данном документе называются «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники может легко получить большое количество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинаций, начиная с описанных в данном документе последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей. В некоторых вариантах реализации изобретения все остатки каркасных и/или CDR-областей в пределах доменов V_H и/или V_L мутированы обратно до остатков, находящихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах реализации изобретения только определенные остатки мутированы обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) отличной от последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, отличной от последовательности зародышевой линии, из которой изначально было получено антитело). Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR-областях, например, когда определенные отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, хотя другие определенные остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы до соответствующего остатка отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко исследовать на наличие одного или более желаемого свойства, такого как улучшение специфичности связывания, повышение аффинности связывания, улучшение или усиление антагонистических или агонистических биологических свойств (в зависимости от ситуации), снижение иммуногенности и т.д. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким образом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает полностью моноклональные антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе и содержащих одну или больше консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

Употребляемый в данном документе термин "человеческое антитело" включает антитела, содержащие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. При этом употребляемый в данном документе термин "человеческое антитело" не включает mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мышей), были привиты в человеческие FR-последовательности.

Термин "рекомбинантный" в общем случае относится к любому белку, полипептиду или клетке, экспрессирующим представляющий интерес ген, которые были получены методами генетической инженерии. Употребляемый в отношении белка или полипептида термин "рекомбинантный" означает полипептид, полученный посредством экспрессии рекомбинантного полинуклеотида. Белки, применяемые в иммуногенных композициях согласно изобретению, можно выделять из природного источника или получать методами генетической инженерии.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Употребляемый в данном документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, которые были получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые при помощи рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных человеческих антител (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из животных (например, мышей), трансгенных в отношении генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, которые были получены, экспрессированы, созданы или выделены любыми другими способами, которые включают сплайсинг генов последовательностей человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат вариабельные и константные области, полученные из последовательности иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии. При этом в определенных вариантах реализации изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются *in vitro* мутагенезу (или когда

используется трансгенное в отношении последовательностей человеческого Ig животное, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H - и V_L -областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и были получены и являются родственными последовательностям V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут не встречаться в природе в пределах набора антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

Термины "специфически связывает" или "специфически связывается с" и им подобные означают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере около 1×10^{-6} или менее (например, меньшее значение K_d означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфическим образом, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Согласно описанию данного документа антитела, которые специфически связываются с РСВ-F, выявляли методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™. Кроме того, в контексте данного документа мультиспецифические антитела, которые связываются с белком РСВ-F и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями РСВ-F, тем не менее, считаются "специфическими связывающими" антителами.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к таким mAb, которые обладают аффинностью связывания с РСВ-F, выраженной в виде K_d , составляющей по меньшей мере 10^{-9} M; более предпочтительно 10^{-10} M, более предпочтительно 10^{-11} M, более предпочтительно 10^{-12} M, и измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или аффинного ELISA-анализа в растворе.

Под терминами "медленная скорость диссоциации", "Кдисс" или "кд" подразумевается антитело, которое диссоциирует от РСВ-F с константой скорости, составляющей $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

Употребляемые в данном документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобные включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Употребляемые в данном документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или более фрагментам, которые сохраняют способность связываться с РСВ-F.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или фрагменты антитела согласно изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим компонентом ("иммуноконъюгат"), таким как антибиотик, второе анти-РСВ-F антитело, вакцина, анатоксин или любой другой терапевтический компонент, применяемый для лечения РСВ-инфекции.

Употребляемый в данном документе термин "выделенное антитело" включает антитело, которое является в значительной степени очищенным от других антител (Ab), имеющих отличную антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает РСВ-F, или его фрагмент, является в значительной степени очищенным от Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от РСВ-F).

Употребляемые в данном документе термины "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело" (или "антитело, которое нейтрализует активность РСВ-F") относятся к антителу, связывание которого с РСВ-F приводит к ингибированию по меньшей мере одного вида биологической активности РСВ-F. Например, антитело согласно изобретению может помочь в блокировании слияния РСВ с клеткой-хозяином или предотвращать образование синцития, или предотвращать первичное заболевание, вызываемое РСВ. В альтернативном варианте антитело согласно изобретению может демонстрировать способность облегчать по меньшей мере один симптом РСВ-инфекции. Такое ингибирование биологической активности РСВ-F можно оценить путем определения одного или более индикаторов биологической активности РСВ-F одним или более из нескольких стандартных методов *in vitro* анализа (такие как анализ нейтрализации, описанный в данном документе) или *in vivo* анализа, известных в данной области техники (например, животные модели для проверки защиты от РСВ после введения одного или более антител, описанных в данном документе).

Употребляемый в данном документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое делает возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени путем выявления изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, при помощи системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Употребляемый в данном документе термин " K_d " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в переменной области молекулы антитела, известным как паратой. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связывать-

ся с разными областями антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к участку антигена, который вызывает ответ В- и/или Т-клеток. Также он относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в общем случае представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые непосредственно влияют на аффинность взаимодействия. Также эпитопы могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах реализации изобретения могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические зарядовые характеристики.

Термин "значительная степень идентичности" или "в значительной степени идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает, что при оптимальном выравнивании с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) при помощи соответствующих нуклеотидных инсерций или делеций наблюдается идентичность нуклеотидной последовательности для по меньшей мере около 90% и более предпочтительно по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований при определении при помощи любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную степень идентичности с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или в значительной степени сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Термин "значительная степень сходства" или "в значительной степени сходный" применительно к полипептидам означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, при помощи программ GAP или BESTFIT с использованием установленных по умолчанию штрафов за открытие гэпа, обладают по меньшей мере 90% идентичности последовательностей, и даже более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичности последовательностей. Предпочтительно, чтобы позиции остатков, которые не являются идентичными, отличались консервативными аминокислотными заменами. "Консервативной аминокислотной заменой" является такая, при которой аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем случае консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В тех случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или сходства можно увеличивать, чтобы сделать поправку на консервативный характер замены. Методы внесения таких поправок хорошо известны специалистам в данной области техники (См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат, аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативное замещение представляет собой любое изменение, соответствующее положительному значению в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et. al. (1992) *Science* 256: 1443-45. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, соответствующее неотрицательному значению в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, как правило, определяют при помощи программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает сходные последовательности, используя степень сходства, присвоенную различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с установленными по умолчанию параметрами для определения гомологичности или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды, полученные от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с установленными по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG Версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) проводит выравнивание и определение процента идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности данного изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей,

полученных из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN с использованием установленных по умолчанию параметров (См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402).

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или фрагмент антитела для применения в способе согласно изобретению может быть моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим.

Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов более чем одного полипептида-мишени. Типовая конструкция биспецифического антитела, которое можно применять в контексте настоящего изобретения, включает использование первого домена иммуноглобулина (Ig) C_H3 и второго домена Ig C_H3, при этом первый и второй домены Ig C_H3 отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, а по меньшей мере одно аминокислотное отличие снижает связывание биспецифического антитела с протеином А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует аминокислотное отличие. В одном варианте реализации изобретения первый домен Ig C_H3 связывает протеин А, а второй домен Ig C_H3 содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание протеина А, такую как модификация Н95R (согласно IMGT-нумерации экзонов; Н435R согласно Европейской нумерации). Вторым C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно Европейской нумерации). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C_H3, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно Европейской нумерации) в случае IgG1 mAb; N44S, K52N и V82I (согласно IMGT; N384S, K392N и V422I согласно Европейской нумерации) в случае IgG2 mAb; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно Европейской нумерации) в случае IgG4 mAb. Предполагается, что описанные выше вариации конструкции биспецифического антитела входят в объем настоящего изобретения.

Под выражением "терапевтически эффективное количество" подразумевается количество, которое приводит к желаемому эффекту, для достижения которого его вводили. Точное количество зависит от цели лечения и уточняется специалистом в данной области техники при помощи известных методов (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

"Иммуногенная композиция" относится к композиции, содержащей антиген/иммуноген, например микроорганизм, такой как вирус или бактерия, или его компонент, белок, полипептид, фрагмент белка или полипептида, цельноклеточный инактивированный, субъединичный или ослабленный вирус, или полисахарид, или комбинацию указанных элементов, вводимой для активации гуморальной и/или клеточной иммунных систем реципиента в отношении одного или более антигенов/иммуногенов, присутствующих в иммуногенной композиции. Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению можно применять для лечения человека, восприимчивого к РСВ-инфекции, посредством введения иммуногенных композиций системным путем. Такое введение может включать инъекцию, осуществляемую внутримышечным (в.м.), интрадермальным (и.д.), интраназальным или ингаляционным путем или подкожным (п.к.) путем; применение пластыря или другого устройства для трансдермальной доставки. В одном варианте реализации изобретения иммуногенную композицию можно применять для производства вакцины или для активации поликлональных или моноклональных антител, которые можно применять для пассивной защиты или лечения млекопитающего.

Употребляемые взаимозаменяемо термины "вакцина" или "композиция вакцины" относятся к композиции, содержащей по меньшей мере одну иммуногенную композицию, которая вызывает иммунный ответ у животного.

В одном варианте реализации изобретения представляющий интерес белок содержит антиген. Употребляемые по отношению к молекуле термины "антиген", "иммуноген", "антигенный", "иммуногенный", "антигенно-активный" и "иммуногенно-активный" относятся к любому веществу, которое способно вызывать специфический гуморальный и/или клеточно-опосредованный иммунный ответ. В одном варианте реализации изобретения антиген содержит эпитоп согласно определению выше.

Употребляемое в данном документе выражение "иммунологически защитное количество" относится к количеству антигена, эффективного в отношении способности вызывать иммуногенный ответ у реципиента, достаточный для предотвращения или облегчения признаков или симптомов заболевания, включая вредное воздействие на здоровье, или его осложнений. Может происходить индукция как гуморального иммунитета, так и клеточно-опосредованного иммунитета. Иммуногенный ответ животного на композицию можно оценить, например, непрямым путем посредством определения титров антител, анализа пролиферации лимфоцитов, или прямым путем, отслеживая признаки и симптомы после стимуляции микроорганизмом. Защитный иммунитет, который обеспечивает иммуногенная композиция или вакцина, можно оценить, определяя, например, уменьшение оболочки стимулирующих организмов, снижение в клинических признаках, таких как смертность, распространенность, температура и общее физическое состояние, здоровье и активность субъекта. Иммунный ответ может включать, без ограничений, индукцию клеточного и/или гуморального иммунитета. Терапевтически эффективное количество компо-

зиции или вакцины может варьироваться в зависимости от конкретно применяемого организма или состояния животного, лечение или вакцинацию которого проводят.

В контексте данного документа "иммунный ответ" или "иммунологический ответ" относится к развитию гуморального иммунного ответа, клеточного иммунного ответа или гуморального и клеточного иммунного ответа на антиген/иммуноген. "Гуморальный иммунный ответ" относится к такому, который, по меньшей мере, частично опосредуется антителами. "Клеточный иммунный ответ" представляет собой такой, который опосредуется Т-лимфоцитами или другими белыми клетками крови или и теми и другими клетками, и включает выработку цитокинов, хемокинов и подобных молекул, вырабатываемых активированными Т-клетками, белыми клетками крови или и теми и другими клетками. Иммунный ответ можно определить при помощи стандартных методов иммуноанализа и анализа нейтрализации, которые известны в данной области техники. В контексте данного документа "иммуногенность" относится к способности белка или полипептида вызывать иммунный ответ, направленный конкретно против бактерии или вируса, который вызывает определенное заболевание.

Общее описание

Респираторный синцитиальный вирус (РСВ) представляет собой отрицательно-полярный одноцепочечный РНК-вирус, который является основной причиной серьезных инфекций дыхательных путей у новорожденных и детей, при этом первичная инфекция возникает у детей возрастом от 6 недель до 2 лет и редко в первые 4 недели жизни во время нозокомиальных эпидемий (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300: 393-396). (Feigen et al., eds., 1987, *B: Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, W B Saunders, Philadelphia at pages 1653-1675; *New Vaccine Development, Establishing Priorities*, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington D.C. на стр. 397-409; Ruuskanen et al., 1993, *Curr. Probl. Pediatr.* 23:50-79; Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300: 393-396). Некоторые группы детей находятся в зоне риска развития РСВ-инфекции, включая недоношенных новорожденных детей (Hall et al. 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396), детей с врожденными пороками верхних дыхательных путей, детей с бронхопульмональной дисплазией (Groothuis et al., 1988, *Pediatrics* 82:199-203), детей с врожденным пороком сердца (MacDonald et al., *New Engl. J. Med.* 307:397-400) и детей с врожденным или приобретенным иммунодефицитом (Ogra et al., 1988, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7: 246-249; и Pohl et al., 1992, *J. Infect. Dis.* 165:166-169) и муковисцидозом (Abman et al., 1988, *J. Pediatr.* 113:826-830).

РСВ может также инфицировать взрослых людей. У этих людей РСВ приводит главным образом к заболеваниям верхних дыхательных путей, хотя для пожилых пациентов может существовать повышенный риск развития серьезной инфекции и воспаления легких (Evans A. S., eds., 1989, *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3rd ed., Plenum Medical Book, New York на стр. 525-544), как и для взрослых людей после курса иммуносупрессивной терапии, в частности для пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга (Hertz et al. 1989, *Medicine* 68:269-281). Другие пациенты, находящиеся в зоне риска, включают пациентов с застойной сердечной недостаточностью и пациентов с хроническим обструктивным заболеванием легких (т.е. ХОЗЛ). Также сообщалось об эпидемиях среди пациентов домов для престарелых и помещенных в специализированные лечебные учреждения людей молодого возраста (Falsey A. R., 1991, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12: 602-608; и Garvie et al., 1980, *Br. Med. J.* 281: 1253-1254).

При том, что методы лечения развившегося РСВ-заболевания ограничены, более тяжелые формы заболевания нижних дыхательных путей часто требуют существенной поддерживающей терапии, включая подачу увлажненного кислорода и проведение искусственной вентиляции легких (Fields et al., eds, 1990, *Fields Virology*, 2nd ed., Vol. 1, Raven Press, New York на стр. 1045-1072).

Было показано, что рибавирин, который является единственным лекарственным препаратом, утвержденным для лечения инфекции, эффективен в лечении воспаления легких и бронхоолита, связанных с РСВ-инфекцией, и способен модифицировать течение тяжелого РСВ-заболевания в случае детей, не страдающих иммунодефицитом (Smith et al., 1991, *New Engl. J. Med.* 325:24-29). Однако применение рибавирина ограничено вследствие опасений, касающихся возможного риска для беременных женщин, которые могут принимать данный лекарственный препарат в виде аэрозоля в условиях стационара. Также его применение ограничено из-за относительно высокой стоимости.

Были выявлены другие пептидные ингибиторы РСВ-инфекции, которые ингибируют рост вируса *in vitro*, но они оказались недейственными в исследованиях *in vivo*, наиболее вероятно, из-за недоступности при пероральном приеме и относительно короткого времени полужизни в циркуляции (Lambert D.M., et al. (1996), *PNAS (USA)* 93: 2186-2191; Magro M. et al. (2010), *J. Virol.* 84: 7970-7982; Park M. et al. (2011), *Anal. Biochem.* 409:195-201).

Также были выявлены другие низкомолекулярные ингибиторы РСВ-инфекции, но их исследование было прекращено по различным причинам, некоторые из которых были связаны с токсичными побочными эффектами (Wyde P.R. et. al. (1998), *Antiviral Res.* 38: 31-42; Nikitenko A.A. et. al (2001), *Bioorg Med Chem Lett* 11:1041-1044; Douglas, J.L., et. al. (2003), *J. Virol* 77:5054-5064; Bonfanti J.F. et. al, (2008), *J. Med Chem* 51: 875-896).

Аналогично, несмотря на то, что целесообразным могло бы стать применение вакцины, коммерчески доступной вакцины на сегодняшний день разработано не было. От нескольких кандидатных вакцин

отказались, а остальные находятся на стадии разработки (Murphy et al., 1994, *Virus Res.* 32:13-36). Разработка вакцины оказалась проблематичной. В частности, понадобилась бы иммунизация в течение раннего неонатального периода, так как пик возникновения заболеваний нижних дыхательных путей приходится на возраст 2-5 месяцев. При этом известно, что в это время неонатальный иммунный ответ является незрелым. Плюс, новорожденные в это время имеют высокие титры материнских антител к РСВ, которые могут снижать иммуногенность вакцины (Murphy et al., 1988, *J. Virol.* 62: 3907-3910 и Murphy et al., 1991, *Vaccine* 9: 185-189).

На данный момент единственным утвержденным подходом профилактики РСВ-заболеваний является пассивная иммунизация. Предварительные сведения, предполагающие защитную роль IgG, были получены в ходе исследований, в которых рассматривались материнские антитела у хорьков (Prince G. A., Ph.D. diss., University of California, Los Angeles, 1975) и людей (Lambrecht et al., 1976, *J. Infect. Dis.* 134:211-217 и Glezen et al., 1981, *J. Pediatr.* 98:708-715).

В Hemming et al. (Morell et al., eds., 1986, *Clinical Use of Intravenous Immunoglobulins*, Academic Press, London на стр. 285-294) рассматривается возможное применение антитела к РСВ в лечении или предотвращении РСВ-инфекции во время исследований, которые включали изучение фармакокинетики внутривенного иммунного глобулина (ВВИТ) у новорожденных, подозреваемых на наличие неонатального сепсиса. Затем та же самая группа исследователей изучала способность гипериммунной сыворотки или иммунного глобулина, обогащенного нейтрализующим РСВ антителом, защищать хлопковых хомяков и приматов от РСВ-инфекции (Prince et al., 1985, *Virus Res.* 3:193-206; Prince et al., 1990, *J. Virol.* 64: 3091-3092; Hemming et al., 1985, *J. Infect. Dis.* 152: 1083-1087; Prince et al., 1983, *Infect. Immun.* 42: 81-87; и Prince et al., 1985, *J. Virol.* 55: 517-520). Результаты этих исследований дают основание предполагать, что нейтрализующее РСВ антитело при профилактическом применении ингибирует репликацию РСВ в дыхательных путях у хлопковых хомяков. При терапевтическом применении антитело к РСВ снижает репликацию вируса в легких в моделях с хлопковыми хомяками и приматами за исключением человека.

Более поздние исследования были сконцентрированы на роли двух гликопротеинов, обозначаемых F и G, находящихся на поверхности РСВ, в качестве мишеней для нейтрализующих антител из-за роли этих гликопротеинов в вирусном присоединении и слиянии с клеткой-хозяином (Fields et. al, 1990, выше; и Murphy et al., 1994, выше). Белок G связывается со специфическим клеточным рецептором, а белок F способствует слиянию вируса с клеткой. Также белок F экспрессируется на поверхности инфицированных клеток и отвечает за последующее слияние с другими клетками, что приводит к образованию синцития. Таким образом, антитела к белку F могут непосредственно нейтрализовать вирус или блокировать слияние вируса с клеткой или предотвращать распространение от клетки к клетке путем предотвращения образования синцития.

Первым гуманизированным антителом, утвержденным для применения в случае педиатрических пациентов для предотвращения вызванных РСВ тяжелых заболеваний нижних дыхательных путей, стал паливизумаб (SYNAGIS®), который иммуноспецифически связывается с белком F и вводится внутримышечно в рекомендуемой месячной дозировке, составляющей 15 мг/кг массы тела, на протяжении сезона РСВ (с ноября по апрель для северного полушария). SYNAGIS® представляет собой композицию из последовательностей человеческих (95%) и мышинных (5%) антител. (Смотрите Johnson et al., (1997), *J. Infect. Diseases* 176: 1215-1224 и патент США № 5824307).

Хотя SYNAGIS® успешно применяли для предотвращения РСВ-инфекции у педиатрических пациентов, необходимость повторных визитов к врачу для многократного внутримышечного введения доз по 15 мг/кг SYNAGIS® не только создавала неудобства для пациента, но также могла приводить к пропускам некоторых доз. Таким образом, существовала потребность в разработке антител, которые сохраняли бы иммуноспецифичность в отношении антигена РСВ, но при этом были бы более эффективными и имели бы улучшенный фармакокинетический профиль и, таким образом, имели бы улучшенный общий терапевтический профиль. Такое антитело описано в патентной публикации США 2003/0091584 и известно под названием мотавизумаб (NUMAX™). Хотя NUMAX™ обладает улучшенными характеристиками связывания, которые могут преодолеть необходимость в больших дозировках, описанных выше для SYNAGIS®, оно также характеризуется 3-5-кратным увеличением частоты появления и тяжести аллергических реакций по сравнению с SYNAGIS®. Дальнейшая разработка NUMAX™ была прекращена.

Соответственно, до сих пор существует потребность в эффективных видах терапии РСВ-инфекции и, в частности, существует потребность в определении более эффективного антитела для предотвращения и лечения РСВ-инфекции без нежелательных побочных явлений, связанных с описанными выше антителами. Несмотря на то, что описанные в данном документе антитела демонстрируют более низкую аффинность связывания с РСВ-F (т.е. антитела согласно настоящему изобретению не связываются настолько сильно с РСВ-F, как паливизумаб), чем та, что была описана для паливизумаба или мотавизумаба, оказалось, что они демонстрируют лучшую нейтрализующую способность и отвечают указанным потребностям.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как цельная РСВ-частица, живая, ослаблен-

ная или инактивированная, или рекомбинантной формой вируса, или очищенным белком F (См. GenBank, номер доступа AAX23994.1 (SEQ ID NO: 354)), или рекомбинантно полученным белком F (Смотрите SEQ ID NO: 353), с последующей иммунизацией вторым иммуногеном (цельным вирусом или очищенным белком F) или иммуногеном активным фрагментом белка F.

Иммуноген может представлять собой ДНК, кодирующую белок F или его активный фрагмент.

Иммуноген может быть получен из N-терминального или C-терминального домена 67 кДа предшественника (F0) или из любого из двух фрагментов, генерируемых из предшественника фурин-подобной протеазой, в результате чего образуются два дисульфидно связанных полипептида, обозначаемых F2 и F1 соответственно из N- и C-конца. Фрагмент может быть получен из любой из известных областей белка PCB-F (см. Sun Z. et al. (2013), *Viruses* 5: 211-225).

Полноразмерная аминокислотная последовательность PCB-F приведена в виде SEQ ID NO: 354 и также приведена в GenBank с номером доступа AAX23994.1.

Генетическая конструкция, содержащая белок F PCB, приведена в виде SEQ ID NO: 353.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела, которые специфически связываются с PCB-F, можно получить, используя фрагменты вышеописанных областей или пептиды, которые простираются за пределы указанных областей на от около 5 до около 20 аминокислотных остатков с любого или обоих, N- или C-терминальных концов описанных в данном документе областей. В определенных вариантах реализации изобретения для получения PCB-F-специфических антител можно применять любую комбинацию вышеописанных областей или их фрагментов. В определенных вариантах реализации изобретения одну или более из вышеописанных областей PCB-F или ее фрагменты можно использовать для получения моноспецифических, биспецифических или мультиспецифических антител.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если не указано иное, употребляемый в данном документе термин "антитело" следует понимать как такой, который включает молекулы антител, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (т.е. "полные молекулы антител"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Употребляемые в данном документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобные включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Употребляемые в данном документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или более фрагментам, которые сохраняют способность специфически связываться с PCB-F. Фрагмент антитела может включать фрагмент Fab, фрагмент F(ab)₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антител при помощи любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие манипуляции с и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или общедоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или ее можно синтезировать. Можно проводить секвенирование ДНК или манипуляции как химические, так и при помощи методов молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для внесения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислоты и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают:

(i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab)₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) наименьшие распознающие компоненты, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMTP) и акульки переменные домены IgNAR, также включены в употребляемое в данном документе понятие "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и в общем случае содержит по меньшей мере одну CDR, которая граничит или находится в одной рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих V_H-домен, ассоциированный с V_L-доменом, V_H- и V_L-домены могут располагаться по отношению друг к другу в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L-домен.

В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может

содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие типовые конфигурации переменных и константных доменов, которые могут находиться в пределах антигенсвязывающего домена антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любые приведенные выше типовые конфигурации, переменные и константные домены могут быть как непосредственно связаны друг с другом, так и связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые образуют гибкое или полугибкое соединение между смежными переменными и/или константными доменами в единичной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любой из вышеприведенных конфигураций переменного и константного домена, находящихся в нековалентной ассоциации друг с другом, и/или с одним или более мономерным V_H - или V_L -доменом (например, посредством дисульфидной(ых) связи(ей)).

Как и в случае полных молекул антител антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическим). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит, как правило, два разных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с отличным эпитопом одного и того же антигена. Любую мультиспецифическую конструкцию антитела, включая раскрытые в данном документе типовые биспецифические конструкции антител, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, используя стандартные и общедоступные в данной области техники методы.

Получение человеческих антител

Способы получения человеческих антител в трансгенных мышах известны в данной области техники. Любые из таких известных способов можно применять в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с PCB-F.

При помощи технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного метода получения моноклональных антител сначала проводят выделение высокоаффинных химерных антител к PCB-F, имеющих человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенных мышей, обладающих геномом, содержащим человеческие переменные области тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с локусами эндогенной мышины константной области, при этом мышшь в ответ на стимуляцию антигеном вырабатывает антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

В общем случае мышшь от VELOCIMMUNE® стимулируют представляющим интерес антигеном, а из экспрессирующих антитело мышшь выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки можно сливать с клеточной линией миеломы для получения иммортальных гибридных клеточных линий и проводить исследование и селекцию таких гибридных клеточных линий, чтобы выявить гибридные клеточные линии, которые вырабатывают антитела, специфические в отношении представляющего интерес антигена. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей, можно выделять и связывать с желаемыми изотипическими константными областями тяжелой и легкой цепей. Подобный белок антитела может вырабатываться в клетке, такой как клетка CHO. В альтернативном варианте ДНК, кодирующую антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как описано ниже в экспериментальном разделе, проводят определение характеристик антител и их селекцию на основании желаемых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышьи константные области замещают желаемыми человеческими константными областями для получения полностью человеческого антитела согласно изобретению, например, IgG1 или IgG4, модифицированного или дикого типа. Хотя выбранная константная область может варьироваться в соответствии с определенным применением, характеристики, отвечающие за высокоаффинное связывание антигена и целевую специфичность, являются свойством переменной области.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению обладают аффинностью (K_D) в диапазоне от около $1,0 \times 10^{-7}$ до около $1,0 \times 10^{-12}$ М согласно данным по связыванию с антигеном, как иммобилизованным на твердофазном субстрате, так и в жидкой фазе. В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению обладают аффинностью (K_D) в диапа-

зоне от около 1×10^{-7} до около 6×10^{-10} М согласно данным по связыванию с антигеном, как иммобилизованным на твердофазном субстрате, так и в жидкой фазе. В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению обладают аффинностью (K_d) в диапазоне от около 1×10^{-7} до около 9×10^{-10} М согласно данным по связыванию с антигеном, как иммобилизованным на твердофазном субстрате, так и в жидкой фазе. Мышечные константные области замещают желаемыми человеческими константными областями для получения полностью человеческого антитела согласно изобретению. Хотя выбранная константная область может варьироваться в соответствии с определенным применением, характеристики, отвечающие за высокоаффинное связывание антигена и целевую специфичность, являются свойством варибельной области. Неожиданно, определенные антитела согласно настоящему изобретению, хоть и демонстрируют более низкие аффинности по сравнению с мотаивизумабом, оказались более эффективными в случае нейтрализации вируса.

Биоэквиваленты

Анти-РСВ-Ф антитела и фрагменты антител согласно настоящему изобретению включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но сохраняют способность связывать РСВ-Ф. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с родительской последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является в значительной степени эквивалентной биологической активности описанных антител. Аналогично, кодирующие антитела последовательности ДНК согласно настоящему изобретению включают последовательности, которые содержат одно или более нуклеотидных добавлений, делеций или замен по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, который является в значительной степени биоэквивалентным антителу или фрагменту антитела согласно изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами и не демонстрируют существенной разницы в скорости и степени поглощения при введении их в той же молярной дозе в сходных экспериментальных условиях как в случае однократной дозы, так и многократной дозы. Некоторые антитела считаются эквивалентными или фармацевтически альтернативными, если они эквивалентны в отношении степени поглощения, но не в отношении скорости поглощения, но могут при этом считаться биоэквивалентными вследствие того, что такие различия в скорости поглощения являются целенаправленными, отражены в мечении и не являются существенными для достижения эффективной концентрации лекарственного препарата в организме, например, при долговременном применении, а также считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного изучаемого лекарственного препарата.

В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или несколько раз чередовать прием стандартного продукта и биологического продукта без ожидаемого увеличения риска развития нежелательных явлений, включая клинически существенные изменения в иммуногенности или уменьшение эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого чередования.

В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка биоэквивалентны, если они имеют общий механизм действия или механизмы действия при определенном условии или условиях применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована *in vivo* и/или *in vitro* способами. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) *in vivo* анализ человека или других млекопитающих, в котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме крови, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) скореллированный *in vitro* анализ, который является приемлемо предиктивным в отношении данных *in vivo* биодоступности для человека; (c) *in vivo* анализ человека или других млекопитающих, в котором определяют соответствующее немедленное фармакологическое действие антитела (или его мишени) как функцию времени; и (d) клиническое исследование в хорошо контролируемых условиях, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител согласно изобретению можно сконструировать, например, путем проведения различных замен остатков или последовательностей или удаления терминальных или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не являются существенными для биологической активности, можно удалять или замещать другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащих аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например мутации, удаляющие или исключающие гликозилирование.

Биологические характеристики антител

В общем случае антитела согласно настоящему изобретению могут действовать путем связывания с РСВ-F и, таким образом, блокировать слияние вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина. Антитела согласно настоящему изобретению могут действовать путем связывания с РСВ-F и, таким образом, блокировать распространение вируса от клетки к клетке и блокировать образование синцития, связанное с инфицированием клеток РСВ.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно настоящему изобретению могут действовать путем блокирования или ингибирования слияния РСВ с клеточной мембраной посредством связывания с любой другой областью или фрагментом полноразмерного нативного белка F, аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 354, а также приведена в GenBank под номером доступа AAX23994.1. Антитела также могут связываться с любой областью, которая содержится в SEQ ID NO: 353, или фрагментом, содержащимся в SEQ ID NO: 353.

В одном варианте реализации в изобретении предложено полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с белком F РСВ подтипа А или В, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или более из следующих характеристик: (а) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) демонстрирует K_D в диапазоне от около 1×10^{-7} до около 6×10^{-10} М; (с) способно нейтрализовать штаммы респираторного синцитиального вируса подтипа А и подтипа В *in vitro*; (d) демонстрирует способность в значительной степени снижать вирусную нагрузку в животной модели РСВ-инфекции, (е) демонстрирует в 1-2 раза большее логарифмическое снижение назальных и/или легочных вирусных титров по сравнению с паливизумабом; (f) демонстрирует эффективную дозу 99 (ED₉₉), составляющую около 0,15 мг/кг или менее при подкожном введении в мышиную модель РСВ-инфекции подтипа А, или ED₉₉, составляющую около 0,62 мг/кг или менее при введении в случае модели РСВ-инфекции подтипа А с хлопковыми хомяками, или ED₉₉, составляющую около 2,5 мг/кг или менее при введении в случае модели РСВ-инфекции подтипа В с хлопковыми хомяками; (g) демонстрирует ED₉₉, приблизительно в 2-3 раза меньшую, чем ED₉₉ для паливизумаба или мотавизумаба; (h) демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 15-17 раз улучшена по сравнению с паливизумабом, или демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более клинических штаммов РСВ подтипа А, которая приблизительно в 10-22 раза улучшена по сравнению с паливизумабом; (i) демонстрирует эффективность нейтрализации лабораторного штамма РСВ подтипа В, которая приблизительно в 2-5 раз улучшена по сравнению с паливизумабом; (j) демонстрирует эффективность нейтрализации лабораторного штамма РСВ подтипа А или клинического штамма РСВ, которая приблизительно в 0,5-2 раза улучшена по сравнению с АМ-22; (k) демонстрирует эффективность нейтрализации одного или более лабораторных штаммов РСВ подтипа В, которая приблизительно в 2,5-17 раз улучшена по сравнению с АМ-22; (l) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 и 338 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (iii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 и 346 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (n) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328 и 344 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей, и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 и 352 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (o) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 и 340 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 и 342 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 и 348 или

в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 и 350 или в значительной степени сходную с ними последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей; (р) взаимодействует с аминокислотной последовательностью, содержащей остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354; (q) взаимодействует с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354; (r) перекрестно не конкурирует с паливизумабом или мотавизумабом за связывание белка РСВ-Ф; (s) ингибирует слияние вируса с клеткой.

Определенные анти-PCB-F антитела согласно настоящему изобретению способны связываться с белком F PCB и нейтрализовать инфекционность обоих подтипов PCB - А и В - согласно данным *in vitro* анализа. Способность антител согласно изобретению связываться и нейтрализовать инфекционность подтипов PCB можно определить стандартными методами, известными специалистам в данной области техники, включая анализ связывания или анализ нейтрализации, или *in vivo* защитный анализ, как описано в данном документе.

Неограничивающие типовые методы *in vitro* и *in vivo* анализа для определения связывающей активности и *in vitro* нейтрализации, а также *in vivo* эффективности проиллюстрированы в примерах 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 данного документа. В примере 3 аффинность связывания и кинетические константы человеческих анти-PCB-F антител определяли методом поверхностного плазмонного резонанса, а измерения проводили при помощи устройства Biacore 4000 или T200. В примере 4 исследовали эффективность антител методом анализа микронейтрализации PCB. Пример 5 демонстрирует способность антител согласно изобретению нейтрализовать PCB-инфекцию *in vivo* в двух разных животных моделях. Примеры 7 и 8 демонстрируют взаимодействие антител согласно изобретению с конкретными участками связывания белка PCB-Ф. Примеры 9 и 10 демонстрируют нейтрализующую способность антител в случае нескольких лабораторных и клинических штаммов PCB подтипов А и В. Пример 11 демонстрирует способность антител согласно изобретению ингибировать слияние вируса с клетками. Пример 12 демонстрирует перекрестное конкурентное связывание различных антител за связывание с PCB-Ф.

Картирование эпитопов и связанные с ним методы

Различные известные специалистам в данной области техники методы можно использовать, чтобы определить, "связывается" ли "антитело с одной или более аминокислотами" в пределах полипептида или белка. Типовые методы включают, например, проведение стандартного перекрестного конкурентного анализа, такого как тот, что описан в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Другие способы включают мутационный анализ с аланиновым сканированием, пептидный блот-анализ (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно применять такие способы, как исключение эпитопов, экстрагирование эпитопов и химическое модифицирование антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для определения аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, регистрируемый при помощи масс-спектрометрии. В общих чертах способ водородно-дейтериевого обмена включает дейтериевое мечение представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Далее, комплекс белок/антитело переносят в воду, а обменные протоны в составе аминокислот, которые защищены комплексом антитела, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород при скорости меньшей, чем в случае обменных протонов в составе аминокислот, которые не являются частью области контакта. В результате аминокислоты, которые формируют часть области контакта белок/антитело, могут сохранять дейтерий и, следовательно, иметь большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в область контакта. После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазами и проводят масс-спектрометрический анализ, выявляя тем самым меченые дейтерием остатки, которые соответствуют определенным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2): 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к участку антигена, который вызывает ответ В- и/или Т-клеток. Эпитопы В-клеток могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, которые располагаются рядом при сворачивании белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются после воздействия денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные при сворачивании белка в третичную структуру, как правило, разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп содержит по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование на основе модификаций (MAP - от англ. "Modification-Assisted Profiling"), также

известное под названием профилирования антител на основе структуры антигенов (ASAP - от англ. "Antigen Structure-based Antibody Profiling"), представляет собой метод, позволяющий категоризировать большие количества моноклональных антител (mAb) против одного и того же антигена в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (US 2004/0101920). Каждая категория соответствует уникальному эпитопу, резко отличающемуся или частично перекрывающемуся с эпитопом, представленным другой категорией. Этот метод позволяет проводить быструю сортировку генетически идентичных антител и, таким образом, чтобы при определении характеристик фокусироваться на генетически отличных антителах. При проведении скрининга гибридомы МАР может способствовать определению редких гибридомных клонов, которые вырабатывают mAb, обладающие желаемыми характеристиками. МАР можно применять для сортировки антител согласно изобретению на группы антител, связывающих разные эпитопы.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне приблизительно от позиции 161 приблизительно до позиции 188 из SEQ ID NO: 354. В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению могут взаимодействовать с аминокислотными остатками, которые простираются за пределы области, определяемой приблизительно 5-10 аминокислотными остатками, или приблизительно 10-15 аминокислотными остатками, или приблизительно 15-20 аминокислотными остатками в направлении аминоконца или карбоксиконца белка РСВ-F.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355 и 356.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах остатков от 161 до 188 из SEQ ID NO: 354.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах SEQ ID NO: 355 или SEQ ID NO: 356.

В одном варианте реализации в изобретении предложено выделенное человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с РСВ-F, или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354.

В настоящее изобретение включены анти-РСВ-F антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любые типовые антитела, описанные в данном документе в табл.1. Аналогично, в настоящее изобретение также включены анти-РСВ-F антитела, которые конкурируют за связывание фрагмента РСВ-F с любым из типовых антител, описанных в данном документе в табл. 1.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно настоящему изобретению перекрестно не конкурируют за связывание РСВ-F с паливизумабом, мотавизумабом или АМ-22.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно настоящему изобретению не связываются с тем же самым эпитопом белка РСВ-F, что и паливизумаб или мотавизумаб.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно настоящему изобретению не связываются с эпитопом РСВ-F, находящимся в диапазоне от аминокислотного остатка 255 до аминокислотного остатка 276 из SEQ ID NO: 354.

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом или конкурирует ли за связывание со стандартным анти-РСВ-F антителом, используя стандартные методы, известные в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же самым эпитопом, что и стандартное антитело к РСВ-F согласно изобретению, стандартному антителу дают возможность связываться с белком или пептидом РСВ-F в насыщающих условиях. Далее оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой РСВ-F. Если исследуемое антитело способно связываться с РСВ-F после насыщающего связывания стандартным анти-РСВ-F антителом, можно заключить, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом по сравнению со стандартным анти-РСВ-F антителом. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой РСВ-F после насыщающего связывания стандартным анти-РСВ-F антителом, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же самым эпитопом, который связывается стандартным анти-РСВ-F антителом согласно изобретению.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание со стандартным анти-РСВ-F антителом вышеописанный метод осуществляют в двух ориентациях: в первой ориентации стандартному антителу дают возможность связываться с молекулой РСВ-F в насыщающих условиях с последующей оценкой

связывания исследуемого антитела с молекулой РСВ-F. Во второй ориентации исследуемому антителу дают возможность связываться с молекулой РСВ-F в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания стандартного антитела с молекулой РСВ-F. Если в случае обеих ориентации только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой РСВ-F, можно заключить, что исследуемое антитело и стандартное антитело конкурируют за связывание РСВ-F. Специалисту в данной области техники понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание со стандартным антителом, не обязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и стандартное антитело, но может стерически блокировать связывание стандартного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Два антитела связываются с тем же самым или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Это означает, что 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно - на 75, 90 или даже 99% согласно данным анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50: 1495-1502). В альтернативном варианте два антитела соответствуют одному и тому же эпитопу, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела соответствуют перекрывающимся эпитопам, если некоторые аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

Затем можно проводить дополнительные стандартные эксперименты (например, анализ мутаций и связывания пептидов), чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела имеет место из-за связывания с тем же самым эпитопом, что и стандартное антитело, или, что за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода можно проводить при помощи ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

Иммуноконъюгаты

В изобретение включено человеческое моноклональное антитело к РСВ-F, конъюгированное с терапевтическим компонентом ("иммуноконъюгат"), таким как агент, способный снижать тяжесть первичного инфицирования РСВ или облегчать по меньшей мере один симптом, связанный с РСВ-инфекцией, включая кашель, высокую температуру, воспаление легких или их тяжесть. Таким агентом может быть второе, отличное антитело к РСВ-F, или вакцина. При выборе типа терапевтического компонента, который можно конъюгировать с анти-РСВ-F антителом, следует учитывать патологическое состояние, лечение которого проводится, и желаемый терапевтический эффект, который должен достигаться. В альтернативном варианте, если желаемым терапевтическим эффектом является лечение осложнений или симптомов, связанных с РСВ-инфекцией, или любого другого патологического состояния, являющегося результатом инфекции, такого как, без ограничений, воспаление легких, целесообразно конъюгировать агент, подходящий для лечения осложнений или симптомов патологического состояния или уменьшать любые побочные явления со стороны антител согласно изобретению. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники, см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими.

Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного полипептида-мишени. См., например, Tutt et al, 1991, J. Immunol. 147: 60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244. Антитела согласно настоящему изобретению могут быть связанными или коэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связанным (например, путем химического сопряжения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или каким-либо другим образом) с одним или более другими молекулярными компонентами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Типовая конструкция биспецифического антитела, которое можно применять в контексте настоящего изобретения, включает использование первого домена иммуноглобулина (Ig) C_{H3} и второго домена Ig C_{H3}, при этом первый и второй домены Ig C_{H3} отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, а по меньшей мере одно аминокислотное отличие снижает связывание биспецифического антитела с протеином А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует аминокислотное отличие. В одном варианте реализации изобретения первый домен Ig C_{H3} связывает протеин А, а второй домен Ig C_{H3} содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание протеина А, такую как модификация N95R (согласно IMGT-нумерации экзонов; H435R согласно Европейской нумерации). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно Ев-

ропейской нумерации). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго Снз, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно Европейской нумерации) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (согласно IMGT; N384S, K392N и V422I согласно Европейской нумерации) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно Европейской нумерации) в случае антител IgG4. Предполагается, что описанные выше вариации конструкции биспецифического антитела входят в объем настоящего изобретения.

Терапевтическое применение и лекарственные формы

В изобретении предложены терапевтические композиции, содержащие анти-PCB-F антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Введение терапевтических композиций в соответствии с изобретением осуществляется с применением подходящих носителей, вспомогательных веществ и других агентов, которые включены в лекарственные формы для того, чтобы обеспечить перенос, доставку, переносимость и т.д. Большое число соответствующих лекарственных форм можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, пузырьки, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные поглощающие пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

Доза каждого из антител согласно настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от возраста и массы субъекта, которому ее вводят, целевого заболевания, патологических состояний, пути введения и тому подобного. Когда антитела согласно настоящему изобретению применяют для лечения РСВ-инфекции у пациента или для лечения одного или более симптомов, связанных с РСВ-инфекцией, таких как кашель или воспаление легких, связанные с наличием у пациента РСВ-инфекции, или для снижения тяжести заболевания, предпочтительно каждое из антител согласно настоящему изобретению вводить внутривенно или подкожно в нормальной единичной дозе, составляющей от около 0,01 до около 30 мг/кг массы тела, более предпочтительно - от около 0,1 до около 20 мг/кг массы тела, или от около 0,1 до около 15 мг/кг массы тела, или от около 0,02 до около 7 мг/кг массы тела, от около 0,03 до около 5 мг/кг массы тела, или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела, или около 1 мг/кг массы тела, или около 3,0 мг/кг массы тела, или около 10 мг/кг массы тела, или около 20 мг/кг массы тела. При необходимости можно вводить многоразовые дозы. В зависимости от тяжести патологического состояния можно корректировать частоту и длительность лечения. В определенных вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере от около 0,1 до около 800 мг, от около 1 до около 600 мг, от около 5 до около 300 мг, или от около 10 до около 150 мг, около 100 или около 50 мг. В определенных вариантах реализации изобретения за начальной дозой может следовать вторая или ряд последующих доз антител или их антигенсвязывающих фрагментов в количестве, которое может быть приблизительно таким же самым или меньшим, чем в начальной дозе, при этом последующие дозы разделены по меньшей мере 1-3 днями; по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями; или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например инкапсуляция в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются этим, интрадермальный, трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые накладки (например, для слизистой оболочки полости рта, слизистой оболочки носа, слизистой оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.) и также ее можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Ее можно вводить в виде аэрозольной лекарственной формы (См. US 2011/0311515 и US 2012/0128669). Все более применимой становится доставка агентов, применяемых для лечения респираторных заболеваний, ингаляционным путем (См. A. J. Bitonti and J. A. Dumont, (2006), Adv. Drug Deliv. Rev, 58: 1106-1118). Кроме того, что он является эффективным в лечении местного заболевания легких, такой механизм доставки также может оказаться целесообразным для системной доставки антител (См. Mailliet et al. (2008), Pharmaceutical Research, vol. 25, No. 6, 2008).

Фармацевтическую композицию также можно доставлять в пузырьках, в частности липосомах (см., например, Langer (1990) Science 249: 1527-1533).

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять при помощи систе-

мы контролируемого высвобождения. В одном варианте реализации изобретения можно использовать насос. В другом варианте реализации изобретения можно использовать полимерные материалы. В другом варианте реализации изобретения систему контролируемого высвобождения можно размещать вблизи мишени для введения композиции, при этом требуется только часть системной дозы.

Инъецируемые препараты могут включать дозировочные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельные инфузии и т.д. Такие инъецируемые препараты можно приготовить общеизвестными методами. Например, инъецируемые препараты можно приготовить, например, путем растворения, суспендирования или эмульсифицирования описанного выше антигена или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, которые традиционно применяются для инъекций. В качестве водных сред для инъекций можно привести, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые можно применять в комбинации с соответствующим растворяющим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионный сурфактант [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизованного касторового масла)] и т.д. В качестве масляных сред применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которое можно применять в комбинации с растворяющим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют подходящую ампулу.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению можно применять приспособление для доставки типа "шприц-ручка". Такое приспособление для доставки типа "шприц-ручка" может быть предназначено для многократного или однократного использования. В многократных приспособлениях для доставки типа "шприц-ручка", как правило, используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко снять и заменить на новый, который содержит фармацевтическую композицию. Затем приспособление для доставки типа "шприц-ручка" можно использовать повторно. В однократном приспособлении для доставки типа "шприц-ручка" сменные картриджи не предусмотрены. Чаще однократные приспособления для доставки типа "шприц-ручка" поставляются уже с предварительно заполненным фармацевтической композицией резервуаром внутри устройства. После того, как фармацевтическая композиция в резервуаре заканчивается, все устройство утилизируется.

Для подкожного введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению применяют многочисленные многократные устройства для доставки типа "шприц-ручка" и автоинжекторы. Примеры включают, но не ограничиваются этим, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), если называть только некоторые. Примеры однократных устройств для доставки типа "шприц-ручка", применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), если называть только некоторые.

Описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения предпочтительно готовят в дозировочных формах в виде единичной дозы, подобранной так, чтобы соответствовать дозе активных ингредиентов. Такие дозировочные формы в виде единичной дозы включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеуказанного антигена обычно составляет от около 5 до около 500 мг на дозировочную форму в единичной дозе; предпочтительно, особенно в случае инъекции, чтобы содержание вышеуказанного антигена составляло от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других дозировочных форм.

Схемы введения

В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения многократные дозы антигена к РСВ-F можно вводить субъекту на протяжении определенного времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз антигена к РСВ-F. В контексте данного документа "последовательное введение" означает, что каждую дозу антигена к РСВ-F вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы

антитела к РСВ-Ф, за которой следует одна или более вторичных доз антитела к РСВ-Ф и, необязательно, одна или более третичных доз антитела к РСВ-Ф.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к РСВ-Ф. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (и называется также "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; а "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антитела к РСВ-Ф, но в общем случае могут отличаться друг от друга частотой введения. В определенных вариантах реализации изобретения, однако количество антитела к РСВ-Ф, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается от дозы к дозе (например, корректируется в сторону увеличения или уменьшения по мере необходимости) в ходе лечения. В определенных вариантах реализации изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в качестве "насыщающей дозы" с последующими дозами, которые вводят не так часто (например, "поддерживающими дозами").

В одном типовом варианте реализации настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Употребляемое в данном документе выражение "непосредственно предшествующая доза" относится к последовательности многократного введения и означает дозу антитела к РСВ-Ф, которую вводят пациенту перед введением следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела к РСВ-Ф. Например, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах реализации изобретения, включающих введение многократных вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично в вариантах реализации изобретения, включающих введение нескольких третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. В альтернативном варианте частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может изменяться в продолжение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом в ходе лечения в зависимости от нужд конкретного пациента после проведения клинического обследования.

Терапевтические применения антител

Из-за способности антител согласно настоящему изобретению связываться с/взаимодействовать с белком слияния РСВ (РСВ-Ф) их целесообразно применять для предотвращения слияния вируса с мембраной клетки-хозяина, для предотвращения распространения вируса от клетки к клетке и для ингибирования образования синцития. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению полезны для предотвращения инфицирования субъекта РСВ при профилактическом введении. В альтернативном варианте антитела согласно настоящему изобретению могут быть полезны для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией, такого как кашель, высокая температура, воспаление легких, или для снижения тяжести, продолжительности и/или частоты инфекции. Также предполагается профилактическое применение антител согласно настоящему изобретению в случае пациентов, подвергающихся риску развития или заражения РСВ-инфекцией. Эти пациенты включают недоношенных новорожденных, доношенных новорожденных, родившихся во время сезона РСВ (с поздней осени до ранней весны), пожилых людей (например, людей возрастом 65 лет и старше) или пациентов с ослабленным иммунитетом вследствие болезни или лечения иммуносупрессорными терапевтическими препаратами, или пациентов, имеющих первопричинное патологическое состояние, которое предрасполагает их к РСВ-инфекции (например, пациентов с муковисцидозом, пациентов с застойной сердечной недостаточностью или другими сердечными патологиями, пациентов с патологиями дыхательных путей, пациентов с ХОЗЛ). Предполагается, что антитела согласно настоящему изобретению можно применять сами по себе или в сочетании со вторым агентом или третьим агентом для лечения РСВ-инфекции или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией, такого как высокая температура, кашель, бронхиолит или воспаление легких, связанное или являющееся результатом такой инфекции. Второй и третий агенты можно доставлять одновременно с антителами согласно изобретению или их можно вводить отдельно, как до, так и после антител согласно изобретению. Второй и третий агенты могут представлять собой вирусные агенты, такие как рибавирин или NSAID, или другие агенты для снижения тем-

пературы или боли, второе отличное антитело, которое специфически связывает РСВ-F, агент (например, антитело), который связывается с другим антигеном РСВ, таким как РСВ-G, вакцину против РСВ, миРНК, специфическую в отношении антигена РСВ.

В дополнительном варианте реализации изобретения представленные антитела применяют для приготовления фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от РСВ-инфекции. В другом варианте реализации изобретения представленные антитела применяют для приготовления фармацевтической композиции для снижения тяжести первичного инфицирования РСВ или для снижения продолжительности инфекции, или для снижения по меньшей мере одного симптома, связанного с РСВ-инфекцией. В дополнительном варианте реализации изобретения представленные антитела применяют в качестве вспомогательной терапии с любым другим агентом, применяемым для лечения РСВ-инфекции, включая противовирусное средство, токсин, вакцину, второе антитело к РСВ-F или любое другое антитело, специфическое в отношении антигена РСВ, включая антитело к РСВ-G, или любой другой паллиативной терапии, известной специалистам в данной области техники.

Комбинированная терапия

Как отмечалось выше, способы согласно настоящему изобретению, в соответствии с некоторыми вариантами его реализации включают введение субъекту одного или более дополнительных терапевтических агентов в комбинации с антителом к РСВ-F. Употребляемое в данном документе выражение "в комбинации с" означает, что дополнительные терапевтические агенты вводят до, после или одновременно с фармацевтической композицией, содержащей анти-РСВ-F антитело. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или параллельное введение анти-РСВ-F антитела и второго терапевтического агента.

Например, при введении "до" фармацевтической композиции, содержащей анти-РСВ-F антитело, дополнительный терапевтический агент можно вводить приблизительно за 72, приблизительно за 60, приблизительно за 48, приблизительно за 36, приблизительно за 24, приблизительно за 12, приблизительно за 10, приблизительно за 8, приблизительно за 6, приблизительно за 4, приблизительно за 2, приблизительно за 1 ч, приблизительно за 30, приблизительно за 15 или приблизительно за 10 мин до введения фармацевтической композиции, содержащей анти-РСВ-F антитело. При введении "после" фармацевтической композиции, содержащей анти-РСВ-F антитело, дополнительный терапевтический агент можно вводить через около 10, через около 15, через около 30 мин, через около 1, через около 2, через около 4, через около 6, через около 8, через около 10, через около 12, через около 24, через около 36, через около 48, через около 60 или через около 72 ч после введения фармацевтической композиции, содержащей анти-РСВ-F антитела. "Одновременное" введение с фармацевтической композицией, содержащей анти-РСВ-F антитело, означает, что дополнительный терапевтический агент вводят субъекту в отдельной дозированной форме в пределах менее 5 мин (до, после или в то же время) относительно введения фармацевтической композиции, содержащей анти-РСВ-F антитело, или вводят субъекту в одной комбинированной дозированной форме, содержащей как дополнительный терапевтический агент, так и анти-РСВ-F антитело.

Комбинированная терапия может включать анти-РСВ-F антитело согласно изобретению и любой другой терапевтический агент, который целесообразно комбинировать с антителом согласно изобретению или с биологически активным фрагментом антитела согласно изобретению.

Например, второй и третий терапевтический агент можно применять как вспомогательное средство для снижения вирусной нагрузки в легких, такое как противовирусное средство, например, рибавирин. Как отмечалось выше, антитела также можно применять в сочетании с другими терапевтическими средствами, включая токсин, специфическую в отношении РСВ вакцину, второе антитело, специфическое в отношении РСВ-F, или антитело, специфическое в отношении другого антигена РСВ, такого как РСВ-G.

Диагностические применения антител

Анти-РСВ-F антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или определения наличия РСВ в образце, например, в диагностических целях. Предполагается, что подтверждение инфекции, которая, как считается, вызвана РСВ, можно осуществить путем определения наличия вируса посредством применения одного или более из антител согласно изобретению. Типовые диагностические методы анализа РСВ могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с анти-РСВ-F антителом согласно изобретению, при этом анти-РСВ-F антитело помечено выявляемой меткой или репортерной молекулой или используется в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения вируса, содержащего белок F, из образцов, полученных от пациентов. В альтернативном варианте немеченое анти-РСВ-F антитело можно использовать в диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое снабжено выявляемой меткой. Выявляемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный компонент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Отдельные типовые методы анализа, которые можно применять для выявления или определения наличия в образце РСВ, содержащего белок F, включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических методах анализа РСВ в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит выявляемые количества белка РСВ-F или его фрагментов в нормальных патологических условиях. В общем случае измеряют уровни РСВ-F в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания или патологического состояния, связанного с наличием РСВ-F), чтобы сначала установить базовый или стандартный уровень белка F из РСВ. Затем этот базовый уровень РСВ-F можно сравнивать с уровнями РСВ-F, измеренными для образцов, полученных от индивидов, у которых подозревается наличие РСВ-инфекции или симптомов, связанных с такой инфекцией.

Вакцины и иммуногенные композиции

В одном аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция или вакцина, которая при введении ее индивиду, предпочтительно человеку, вызывает у такого индивида иммунный ответ на антиген респираторного синцитиального вируса (РСВ), например полипептид РСВ-F, при этом композиция может содержать рекомбинантный белок РСВ-F или полипептидный фрагмент белка РСВ-F, или эпитоп, находящийся в пределах и полученный из антигена полипептида РСВ-F или его фрагмента, и/или содержит ДНК и/или РНК, которая кодирует и экспрессирует эпитоп из антигена полипептида РСВ-F или других полипептидов согласно изобретению. Иммуногенную композицию или вакцину можно применять терапевтически или профилактически и можно применять, чтобы активировать иммунитет антител и/или клеточный иммунитет, такой как клеточный иммунитет, обусловленный ЦТЛ или CD4+ Т-клетками.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция или вакцина может содержать белок РСВ-F, приведенный в SEQ ID NO: 354. В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция или вакцина может содержать полипептидный фрагмент РСВ-F, содержащий остатки от 161 до 188 из SEQ ID NO: 354. В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция или вакцина может содержать один или более аминокислотных остатков, находящихся в пределах SEQ ID NO: 355 и/или SEQ ID NO: 356. В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция или вакцина может содержать SEQ ID NO: 355 и/или SEQ ID NO: 356.

В родственном аспекте в изобретении предложен способ индукции иммунного ответа у индивида, в частности млекопитающего, предпочтительно человека, путем введения индивиду иммуногенной композиции или вакцины, содержащей белок РСВ-F или его иммуногенный фрагмент, или антиген РСВ-F или его иммуногенный фрагмент, содержащий один или более эпитопов, находящихся в пределах антигена РСВ-F или его фрагмента, достаточной чтобы вызвать иммунный ответ антител и/или Т-клеток, для защиты индивида от инфицирования, в частности инфицирования респираторным синцитиальным вирусом (РСВ). Также предложены способы применения иммуногенных композиций или вакцин согласно изобретению для индукции иммунного ответа, что приводит к ингибированию или замедлению прогрессирования распространения вируса от клетки к клетке. Также предложены способы для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного в РСВ-инфекцией, путем введения иммуногенной композиции или вакцины, содержащей по меньшей мере один антиген РСВ-F или один или более эпитопов, находящихся в пределах антигена РСВ-F, которая при введении будет индуцировать у индивида иммунный ответ.

Например, в одном варианте реализации в изобретении предложен способ индукции иммунного ответа у индивида, включающий доставку индивиду иммуногенной композиции или вакцины, содержащей антиген РСВ-F (например, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 354) или его антигенный фрагмент (например, полипептид, содержащий остатки от 161 до 188 из SEQ ID NO: 354), или нуклеотидный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность для управления экспрессией такого вирусного полипептида или его фрагмента или варианта *in vivo*, чтобы индуцировать иммунный ответ.

В одном варианте реализации изобретения полипептид для применения в иммуногенной композиции или вакцине для индукции иммунного ответа у индивида содержит остатки от 161 до 188 из SEQ ID NO: 354. В одном варианте реализации изобретения полипептид для применения в иммуногенной композиции или вакцине для индукции иммунного ответа у индивида содержит один или более аминокислотных остатков, находящихся в пределах SEQ ID NO: 355 и/или SEQ ID NO: 356. В одном варианте реализации изобретения полипептид для применения в иммуногенной композиции или вакцине для индукции иммунного ответа у индивида содержит SEQ ID NO: 355 и/или SEQ ID NO: 356. В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция или вакцина может вызывать ответ антител, специфических в отношении антигена РСВ-F РСВ, при этом сгенерированные антитела взаимодействуют с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354 или треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354 или как с серином в позиции 173 из SEQ ID NO: 354, так и с треонином в позиции 174 из SEQ ID NO: 354.

В определенных вариантах реализации изобретения целесообразно, чтобы антигены РСВ-F или их фрагменты вносили в составы иммуногенных композиций или вакцин, которые содержат иммуногенные, предпочтительно иммунологически эффективные количества дополнительных антигенов для того, чтобы активировать иммунитет в отношении других патогенов, дополнительно вирусов и/или бактерий. Такие дополнительные антигены могут включать антиген вируса гриппа, антиген из метапневмовируса или

коронавируса, антиген из *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* или *Bordetella pertussis*. В иммуногенные композиции или вакцины могут быть включены другие антигены РСВ, такие как гликопротеин РСВ-G или его иммуногенные фрагменты, белок HN или его производные. В определенных вариантах реализации изобретения антигены вируса гриппа, предназначенные для включения в иммуногенные композиции или вакцины согласно изобретению, могут включать цельный, живой или инактивированный вирус, расщепленный вирус гриппа, выращенный в яйцеклетках или клетках Мадин-Дарби почек собак, или клетки Веро или полные виросомы гриппа, или их очищенные рекомбинантные белки, такие как белки HA, NP, NA или M, или комбинации вышеуказанных элементов.

В определенных вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция или содержащая вакцину лекарственная форма может содержать рекомбинантный полипептид и/или полинуклеотид согласно изобретению или их комбинацию вместе с подходящим носителем/вспомогательным веществом, таким как фармацевтически приемлемый носитель/вспомогательное вещество. Иммуногенную композицию и/или вакцину предпочтительно вводят парентерально, включая, например, подкожное, внутримышечное, внутривенное или интрадермальное введение. Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические соединения и растворы, которые придают лекарственной среде изотоничность с жидкостью организма индивида, предпочтительно кровью; водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты или загустители. Лекарственные среды могут быть представлены в однодозовых или многодозовых контейнерах, например, запечатанных ампулах и флаконах, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, при этом непосредственно перед применением требуется только добавление стерильного жидкого носителя.

Иммуногенная композиция или содержащая вакцину лекарственная форма согласно изобретению может также содержать адъюванты, чтобы усилить иммуногенность лекарственной среды. В настоящее время единственными адъювантами, которые широко применяются на людях, являются квасцы (фосфат алюминия или гидроксид алюминия) и гели на основе фосфата кальция. Полный адъювант Фрейнда и другие адъюванты, применяемые в исследованиях и ветеринарных применениях, обладают токсичностью, которая ограничивает их потенциальное применение в человеческих вакцинах. При этом, в стадии разработки находятся химически определенные препараты, такие как масляные эмульсии и лекарственные формы на основе сурфактантов, например, MF59 (микрофлюидизированная стабилизированная детергентом эмульсия типа "масло в воде"), QS21 (очищенный сапонин), AS02 [SBAS2] (эмульсия типа "масло в воде" + MPL + QS-21), Montanide ISA-51 и ISA-720 (стабилизированная эмульсия типа "вода в масле"). Кроме того, в стадии разработки для применения на людях находятся микробные производные (природные и синтетические), например, мурамил-дипептид, монофосфорил липид А (например, 3 De-O-ацилированный монофосфорил липид А, также известный как 3D-MPL, который производится Ribi Immunochem, Montana), Detox (MPL + каркас клеточной стенки *M. Phlei*), AGP [RC-529] (синтетический ацилированный моносахарид), DCChol (липоидальные иммуностимуляторы, способные самоорганизовываться в липосомы), OM-174 (производное липиды А), мотивы CpG (синтетические олигонуклеотиды, содержащие иммуностимулирующие мотивы CpG), модифицированные LT и СТ (генетически модифицированные бактериальные токсины для обеспечения нетоксичного воздействия адъюванта) и QS21 - Hplc-очищенная нетоксичная фракция, полученная коры *Quillaja Saponaria Molina*.

Предпочтительная форма 3 De-O-ацилированного монофосфорил липиды А раскрыта в Европейском патенте 0689454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Другие дисперсные адъюванты включают, например, виросомы (однослойные липосомные носители, в которые включены вирусные антигены), AS04 ([SBAS4] A1 соль с MPL), ISCOMS (структурный комплекс сапонинов и липидов), полилактид ко-гликолид (ПЛГ).

Другие подходящие адъюванты включают все приемлемые иммуностимулирующие соединения, такие как цитокины, хемокины или колониестимулирующие факторы. Например, они могут включать интерлейкины IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, гамма-интерферон и hGM-CSF.

Следует понимать, что адъювант и/или иммуностимулирующее соединение, предназначенное для применения, будет зависеть от субъекта, которому вводят вакцину или иммуногенную композицию, способ проведения инъекции и количества планирующихся инъекций.

Хотя изобретение было описано в отношении определенных полипептидов РСВ-F, следует понимать, что в него включены фрагменты полипептидов природного происхождения и сходных полипептидов с добавлениями, делециями или заменами, которые не оказывают существенного влияния на иммуногенные свойства рекомбинантных полипептидов или полинуклеотидов.

Примеры

Следующие примеры представлены таким образом, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное изложение и описание того, как создавать и применять способы и композиции согласно изобретению, и не ограничивают объема того, что авторы считают своим изобретением. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, доли представляют собой массовые доли, молекулярная масса представляет собой

среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение человеческих антител к белку РСВ-F

Для получения антител к белку РСВ-F можно использовать иммуноген, содержащий любой из нижеприведенных элементов. В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как изолят цельного респираторного синцитиального вируса, живого, ослабленного или убитого/инактивированного. Мышам можно вводить одну или более повторных доз, содержащих такой же вирусный изолят, или им можно повторно вводить сам белок РСВ-F. В определенных вариантах реализации изобретения мышам инъецируют живым вирусом, за которым следует повторная инъекция конструкцией, приведенной в виде SEQ ID NO: 353, или выделенным белком РСВ-F, полученным из вирусного изолята или рекомбинантным путем (см. также GenBank, номер доступа AAX23994.1)

В определенных вариантах реализации изобретения антитела согласно изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как биологически активный РСВ подтипа А или В и/или белком (F) слияния РСВ, или иммуногенным фрагментом белка слияния РСВ (РСВ-F), или ДНК, кодирующей полноразмерный белок или его активный фрагмент. Иммуноген может быть доставлен животному любым путем, включая, но не ограничиваясь этим, внутримышечный, подкожный, внутривенный или интраназальный пути.

В определенных вариантах реализации изобретения цельный вирус или белок РСВ-F или его фрагменты можно использовать для получения моноспецифических, биспецифических или мультиспецифических антител.

Цельный вирус или полноразмерные белки, или их фрагменты, которые применяли в качестве иммуногенов, как указано выше, вводили прямым путем в сочетании с адьювантом для стимуляции иммунного ответа мыши от VELOCIMMUNE®, несущей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина. Иммунный ответ антител отслеживали методом иммуноанализа РСВ-F. После достижения желаемого иммунного ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками мышинной миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать гибридомные клеточные линии. Проводили скрининг и селекцию гибридомных клеточных линий, чтобы определить клеточные линии, которые вырабатывают РСВ-F-специфические антитела. При помощи этой методики и различных вышеописанных иммуногенов получали несколько химерных антител (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и мышинными константными доменами); отдельные типовые антитела, полученные таким образом, были обозначены как H1M3621N, H1M3622N, H1M2634N и H1M3627N.

Анти-РСВ-F антитела выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1. При помощи этого метода получали несколько полностью человеческих анти-РСВ-F антител (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами); типовые антитела, полученные таким образом, были обозначены следующим образом: H1N3564P, H1N3565P, H1N3566P, H1N3567P, H1N3581P, H1N3583P, H1N3589P, H1N3591P, H1N3592P, H1N3597P, H1N3598P, H1N3603P, H1N3604P, H1N3605P, H1N3607P, H1N3608P2, H1N3592P2 и H1N3592P3.

Биологические свойства типовых антител, полученных в соответствии с методами данного примера, подробно описаны в приведенных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей

В табл.1 приведены пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей для выбранных антител, специфических в отношении белка РСВ-F, и соответствующие им обозначения антител. Как правило, антитела в данном документе обозначают в соответствии со следующей номенклатурой: приставка Fc (например, "H4N", "H1M", "H2M"), за которой следует числовое обозначение (например, "3117", как показано в табл. 1), за которым следует суффикс "P" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой, антитело может быть обозначено, например, как "H1N3117". Приставки H4N, H1M и H2M в используемых в данном документе обозначениях антител указывают на конкретную Fc-область антитела. Например, антитело "H2M" имеет мышиную IgG2 Fc, в то время как антитело "H4N" имеет человеческую IgG4 Fc. Специалисту в данной области техники понятно, что антитело H1M или H2M можно преобразовать в антитело H4N и наоборот, но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числами, приведенными в табл. 1, останутся теми же. Антитела, имеющие одинаковые числовые обозначения, но отличающиеся буквой в суффиксе - N, B или P, относятся к антителам, имеющим тяжелые и легкие цепи с идентичными последовательностями CDR, но содержащим вариации последовательностей в областях, выходящих за пределы последовательностей CDR (т.е., в каркасных областях). Таким образом, варианты N, B и P конкретного антитела имеют идентичные последовательности CDR в пределах переменных областей их тяжелой и легкой цепей, но отличаются друг от друга в каркасных областях.

Антитела сравнения

В целях сравнения в следующие примеры были включены контрольные анти-РСВ-F антитела. Также в примерах использовали изотипически сходный отрицательный контроль. Одно контрольное анти-

PCB-F антитело обозначено в данном документе как Контроль I и представляет собой гуманизированное анти-PCB-F антитело с последовательностями варибельных доменов тяжелой и легкой цепей гуманизованного антитела паливизумаб (SYNAGIS®), описанного в US 7635568 и US 5824307. Варибельные легкие и тяжелые цепи экспрессировали с человеческими каппа и гамма-1 константными областями соответственно. Одно анти-PCB-F антитело обозначено в данном документе как Контроль II и представляет собой гуманизированный вариант анти-PCB-F антитела паливизумаб с последовательностями варибельных доменов тяжелой и легкой цепей гуманизованного антитела мотавизумаб (NUMAX™), описанного в US 2003/0091584 и в Wu et al, (2007), J. Mol. Biol. 368: 652-665. Варибельные легкие и тяжелые цепи экспрессировали с человеческими каппа и гамма-1 константными областями соответственно. Другое анти-PCB-F антитело обозначено как Контроль III (также называемое AM-22) и описано в патенте США № 8568726. Аминокислотная последовательность тяжелой и легкой цепей AM-22 приведена в SEQ ID NO: 357 (для тяжелой цепи антитела) и SEQ ID NO: 358 (для легкой цепи антитела).

Таблица 1

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H3564P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H3565P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H3566P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H3567P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H3581P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H3583P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H3589P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H3591P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H3592P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H3597P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H3598P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H3603P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H3604P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H3605P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H3607P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H3608P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H3592P2	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H3592P3	274	276	278	280	282	284	286	288
H1M3621N	290	292	294	296	298	300	302	304
H1M3622N	306	308	310	312	314	316	318	320
H1M2634N	322	324	326	328	330	332	334	336
H1M3627N	338	340	342	344	346	348	350	352

Пример 3. Аффинность связывания и кинетические константы человеческих моноклональных анти-PCB-F антител, определенные методом поверхностного плазменного резонанса

Аффинность связывания и кинетические константы человеческих моноклональных анти-PCB-F антител определяли методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C (табл. 2-3). Измерения проводили на приборе Biacore 4000 или T-200. Антитела, экспрессируемые с мышшиной Fc (AbPID приставка H1M; H2M) или человеческой IgG1 Fc (AbPID приставка H1H), захватывались на антимишшиной-Fc или античеловеческой-Fc сенсорной поверхности (формат Mab-захвата), а растворимый мономерный (RSV-F.mmh; SEQ ID NO: 353) белок впрыскивали по всей поверхности. Все исследования связывания при помощи Biacore проводили в подвижном буфере HBST (0,01 М ГЭПЭС, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТУ, 0,005% об/об сурфактанта P20). Разные концентрации RSV-F.mmh, приготовленного в подвижном буфере HBST, впрыскивали по всей поверхности захвата моноклональных анти-PCB-F антител со скоростью потока 30 мкл/мин (Biacore 4000) или со скоростью потока 50 мкл/мин (Biacore T-200), а ассоциацию RSV-F.mmh с захваченным моноклональным антителом отслеживали на протяжении 6 мин и 3 мин соответственно. Диссоциацию RSV-F.mmh от моноклонального антитела в подвижном буфере HBST отслеживали на протяжении 8-10 мин при 25°C. Константы скорости кинетической ассоциации (k_a) и

диссоциации (k_d) определяли путем обработки и аппроксимации данных 1:1 моделью связывания при помощи программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0. Равновесные константы диссоциации (K_d) для связывания и диссоциативные времена полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости как: K_d (М) = k_d/k_a и $t_{1/2}$ (мин) = $(\ln 2)/(60 * k_d)$.

Анти-PCB-F антитела согласно изобретению демонстрировали широкий диапазон аффинностей к RSV-F.mmh. Контроль I, полученный на основании общедоступной последовательности паливизумаба, приведенной в US 7635568, и Контроль II, полученный из общедоступной последовательности мотавизумаба, описанной в Wu et al., (2007), (J. Mol. Biol. 368: 652-665), демонстрировали приблизительно ~70-кратную разницу (контроль I; 38 нМ по сравнению с контролем II; 0,43 нМ) в аффинности, о которой сообщалось ранее.

Таблица 2. Аффинность связывания гибридных mAb при 25°C (Biacore)

Связывание при 25°C / формат Mab-захвата				
AbPID	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1M3621N	2,05E+05	2,08E-04	1,01E-09	56
H1M3622N	3,84E+04	9,13E-05	2,38E-09	127
H1M3624N	1,79E+05	1,83E-04	1,02E-09	63
H1M3627N	2,59E+05	5,23E-04	2,02E-09	22

Таблица 3. Аффинность связывания mAb, содержащих человеческую Fc, при 25°C (Biacore)

Связывание при 25°C / формат Mab-захвата				
AbPID	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H3564P	3,10E+03	7,78E-05	2,50E-08	148
H1H3565P	1,93E+04	5,80E-05	3,01E-09	199
H1H3566P	2,04E+04	4,20E-05	2,06E-09	275
H1H3567P	6,05E+04	2,63E-03	4,34E-08	4
H1H3581P	НС	НС	НС	НС
H1H3583P	8,94E+04	3,08E-03	3,44E-08	4
H1H3589P	3,77E+04	9,14E-03	2,43E-07	1
H1H3591P	4,46E+04	1,53E-03	3,42E-08	8
H1H3592P	1,06E+05	4,66E-04	4,39E-09	25
H1H3592P2	9,93E+04	1,46E-03	1,47E-08	8
H1H3592P3	8,86E+04	7,47E-04	8,43E-09	15
H1H3597P	НС	НС	НС	НС
H1H3598P	НС	НС	НС	НС
H1H3603P	3,00E+03	1,23E-04	4,10E-08	94
H1H3604P	3,10E+03	9,27E-05	3,00E-08	125
H1H3605P	2,80E+03	1,68E-04	5,90E-08	69
H1H3607P	4,20E+03	1,48E-04	3,50E-08	78
H1H3608P2	4,85E+03	2,60E-05	5,35E-09	445
H1H3627N	2,56E+05	1,49E-04	5,81E-10	78
Контроль I	6,75E+04	2,57E-03	3,81E-08	4
Контроль II	1,89E+05	8,13E-05	4,29E-10	142

НС: В условиях эксперимента связывание не наблюдалось

Пример 4. Антитела к белку слияния респираторного синцитиального вируса (PCB-F) демонстрируют эффективную нейтрализующую способность по отношению к штаммам PCB подтипа А и подтипа В

Очищенные антитела исследовали методом анализа микронейтрализации PCB для определения эффективности. Вкратце, 10^4 клеток HEp-2, культивируемых в среде MEM с высоким содержанием глюкозы, дополненной 5% Nuclone ФБС, L-глутамином и антибиотиками, высевали в 96-луночные черные микропланшеты с прозрачным дном и инкубировали на протяжении 16-18 ч (37°C, 5% CO₂). Далее различные концентрации антител, начиная с 666 нМ с последующими разведениями 1:5 в среде, инкубировали со штаммом PCB 1540 (A2) при МИ 0,04 на протяжении 2 ч (37°C, 5% CO₂). Были включены не со-

державшие вируса и нерелевантные контрольные образцы.

После инкубации смесь антитело:вирус добавляли к клеткам HEp-2 и поддерживали процесс инфицирования на протяжении 3 дней. Степень инфицирования определяли, фиксируя клетки в 2% ПФА и проводя ELISA с козьими анти-PCB/анти-козьими, конъюгированными с пероксидазой хрена антителами. В лунки добавляли люминесцентные реагенты и регистрировали сигнал при помощи планшет-ридера (Victor X3, Perkin Elmer). Величины люминесценции анализировали при помощи трехпараметрического логистического уравнения для 11 -точечной кривой (GraphPad Prism).

Антитела согласно изобретению демонстрировали широкий диапазон нейтрализующих активностей против штамма PCB A2 (1540) (табл. 4-5). Несколько антител демонстрировали более низкие величины IC₅₀, чем контроль I, в то время как всего несколько типовых антител H1N3627N, H1N3591P, H1N3592P и H1N3592P3 продемонстрировали лучшую нейтрализацию, чем контроль II. Выбранные антитела (H1N3627N, H1N3592P3) также исследовали в отношении их способности нейтрализовать штаммы PCB подтипа B (табл. 6).

Этот пример демонстрирует эффективность антител согласно данному изобретению в отношении нейтрализации нескольких штаммов PCB-F двух подтипов *in vitro*, которая превышает эффективность, демонстрируемую ранее стандартными контрольными антителами.

Таблица 4. Эффективность нейтрализации для выбранных mAb против PCB A2 (1540)

AbPID	IC ₅₀ [nM] для нейтрализации PCB A2:						
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	Испытание 5	Испытание 6	Испытание 7
H1N362 1N	582	180	-	-	-	-	-
H1N362 2N	320	82	-	-	-	-	-
H1N362 4N	540	270	92	-	-	-	-
H1N362 7N	4	4	5	-	-	10	-
H1N356 4P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N356 5P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N356 6P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N356 7P	-	-	-	257	-	390	-
H1N358 1P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N358 3P	-	-	-	-	50	-	-
H1N358 9P	-	-	-	-	300	-	-
H1N359 1P	-	-	-	6	-	8	6
H1N359 2P	-	-	-	6	-	5	4
H1N359 2P3							10
H1N359 7P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N359 8P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N360	>10000	-	-	-	-	-	-
3P							
H1N360 4P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N360 5P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N360 7P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N360 8P2	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N357 0P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1N362 7N	-	-	-	-	-	-	3
Control 1	1820	950	290	530	160	500	250
Control 2	50	30	23	20	12	12	12

Таблица 5. Эффективность нейтрализации для выбранных mAb против РСВ подтипа А

AbPID	Нейтрализация подтипа А: IC ₅₀ и кратность улучшения по сравнению с контролем I			
	Нейтрал. РСВ-А2 (1540) IC ₅₀ [нМ]	Кратность	Нейтрал. РСВ-длин. IC ₅₀ [нМ]	Кратность
Н1Н3627N	2,6	138	7,3	73
Н1Н3592P3	10	36	15	35
Контроль I	360	--	536	--
Контроль II	14	25	65	8,2

Таблица 6. Эффективность нейтрализации для выбранных mAb против РСВ подтипа В

AbPID	Нейтрализация подтипа В: IC ₅₀ и кратность улучшения по сравнению с контролем I			
	Нейтрал. РСВ – 1580 IC ₅₀ [нМ]	Кратность	Нейтрал. РСВ – 9320 IC ₅₀ [нМ]	Кратность
Н1Н3627N	6,7	55	11	42
Н1Н3592P3	31	12	100	4,6
Контроль I	375	--	460	--
Контроль II	43	8,7	56	8,2

Пример 5. Выбранные анти-РСВ-F антитела демонстрируют эффективную нейтрализацию РСВ-инфекции *in vivo*

А. Мышиная модель

Для исследований *in vivo* нейтрализации РСВ, в которых использовали мышей штамма Balb/c, выбрали типовые антитела Н1Н3627N и Н1Н3592P3. Вкратце, Balb/c мышам в возрасте 7 недель (n = 4-5) проводили ПК инъекцию в двух дозировках (0,15 или 0,05 мг/кг), применяя Н1Н3627N, Н1Н3592P3, контроль I, контроль II или изотипически сходное антитело. Во всех экспериментах применяли антителеноситель (1 мг/кг), чтобы минимизировать потерю анти-РСВ-F антител.

Через один день после инъекции мышей стимулировали интраназальным путем 50 мкл (10⁶ БОЕ) штамма РСВ А2 (1540). Через четыре дня после инфицирования брали образцы сыворотки крови, мышей умерщвляли, а легкие изымали и гомогенизировали в 1 мл ФСБ при помощи гомогенизатора OmniGLH. Легочные гомогенаты центрифугировали для удаления продуктов клеточного распада, а часть супернатанта использовали для определения концентрации анти-РСВ-F mAb в легких. Оставшийся супернатант использовали для проведения серийных разведений, которые инкубировали с клетками HEp-2 на протяжении 2 ч, чтобы дать возможность вирусу попасть в клетки. После этого супернатант удаляли, а клетки покрывали 1% метилцеллюлозой. Через шесть дней клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым, подсчитывали бляшки и рассчитывали log₁₀ снижения вирусной нагрузки по сравнению с изотипическим контролем.

Типовые антитела Н1Н3627N и Н1Н3592P3 оказались более эффективными в снижении вирусной нагрузки *in vivo*, чем контрольное I или контрольное II анти-РСВ-F антитела (табл. 7а-7е). В частности, при дозировке 0,15 мг/кг антитела Н1Н3627N, Н1Н3592P3 и контрольное антитело II все эффективно снижали степень РСВ-инфекции в легких практически до неопределяемого уровня по сравнению с контролем I (кратность изменения log(10) снижения вирусной нагрузки ≥ 2,10). Определение общего человеческого IgG в легких и сыворотке крови подтвердило, что уровни антител были относительно сопоставимы для всех групп.

При более низкой вводимой дозе была очевидной большая разница в эффективности нейтрализации между тремя антителами по сравнению с контролем I. При 0,05 мг/кг Н1Н3592P3 демонстрировало наибольшее снижение вирусной нагрузки с кратностью изменения в диапазоне от 1,49 до > 2,07 log по сравнению с кратностью изменения снижения вирусной нагрузки, составляющей от 1,08 до 1,36 log для Н1Н3627N и от 0,01 до 0,65 log для контроля II. Контроль I при этой самой низкой дозировке оказался умеренно эффективным с изменением снижения вирусной нагрузки, составляющим от 0,03 до 1,03 log.

Результаты свидетельствуют о том, что оба антитела, Н1Н3627N и Н1Н3592P3, являются эффективными нейтрализующими антителами *in vivo*, при этом последнее продемонстрировало тенденцию к более эффективной нейтрализации РСВ-инфекции при более низких дозах.

Эксперимент с определенным диапазоном дозировок проводили, следуя тому же самому протоколу, который описан выше, проводя ПК инъекции 4 разных доз контрольного антитела I (0,6, 0,3, 0,15 и 0,05

мг/кг) и двух доз (0,15 и 0,05 мг/кг) Н1Н3592Р3 и контроля II. Снижение вирусной нагрузки в легких рассчитывали в виде процентной доли от изотипического контроля (Эксп. М4, табл.7d-e).

Типовое антитело Н1Н3592Р3 оказалось более эффективным в снижении вирусной нагрузки *in vivo* (у мышей), чем контрольное I или контрольное II анти-PCB-F антитела. Кроме того, доза контроля I, необходимая для достижения 99% снижения вирусной нагрузки в легких, была в 3-4 раза выше, чем доза Н1Н3592Р3.

Таблицы 7(a-e). Снижение вирусной нагрузки PCB (log (10)) у мышей после введения анти-PCB-F антител

Таблица 7а

Эксп. М1		Доза: 0,15 мг/кг			Доза: 0,05 мг/кг		
PID	Мышей в группе	Снижение вирусной нагрузки (log10)	mAb [нг/мл] Легкие	mAb [нг/мл] Сыворотка	Снижение вирусной нагрузки (log10)	mAb [нг/мл] Легкие	mAb [нг/мл] Сыворотка
Н1Н3627N	5	>2,10	35 ± 18	1041 ± 212	1,20	7 ± 4	274 ± 38
Н1Н3592Р3	5	>2,10	44 ± 14	1731 ± 770	>2,07	17 ± 4	438 ± 51
Контроль I	5	1,02	33 ± 11	895 ± 132	1,03	9 ± 5	365 ± 111
Контроль II	5	>2,10	82 ± 24	1948 ± 429	0,65	7 ± 4	555 ± 80
Изотип. контр.	5	Нет данных	76 ± 28	2180 ± 197	Нет данных	25 ± 2	1287 ± 120

Таблица 7б

Эксп. М2		Доза: 0,15 мг/кг			Доза: 0,05 мг/кг		
PID	Мышей в группе	Снижение вирусной нагрузки (log10)	mAb [нг/мл] Легкие	mAb [нг/мл] Сыворотка	Снижение вирусной нагрузки (log10)	mAb [нг/мл] Легкие	mAb [нг/мл] Сыворотка
Н1Н3627N	5	>2,51	23 ± 8	724 ± 148	1,08	3 ± 3	300 ± 35
Н1Н3592Р3	5	>2,51	27 ± 5	1261 ± 74	1,49	10 ± 2	333 ± 55
Контроль I	5	0,79	9 ± 2	611 ± 61	0,15	1 ± 1	221 ± 35
Контроль II	5	2,31	13 ± 8	587 ± 36	0,01	1 ± 3	237 ± 22
Изотип. контр.	5	Нет данных	46 ± 12	1389 ± 170	Нет данных	15 ± 4	498 ± 92

Таблица 7с

Эксп. М3		Доза: 0,15 мг/кг			Доза: 0,05 мг/кг		
PID	Мышей в группе	Снижение вирусной нагрузки (log10)	mAb [нг/мл]	mAb [нг/мл]	Снижение вирусной нагрузки (log10)	mAb [нг/мл]	mAb [нг/мл]
			Легкие	Сыворотка		Легкие	Сыворотка
H1N3627N	4	2,7	26 ± 6	1143 ± 83	1,36	7 ± 1	394 ± 16
H1N3592P3	4	>2,83	31 ± 12	947 ± 105	1,66	13 ± 4	371 ± 21
Контроль I	4	1,00	58 ± 14	1426 ± 114	0,03	6 ± 5	442 ± 27
Контроль II	4	2,35	20 ± 6	1152 ± 142	0,54	НПО	373 ± 21
Изотип. контр.	4	Нет данных	41 ± 3	808 ± 52	Нет данных	37 ± 8	326 ± 26

Таблица 7d

Эксп. М4 (ED ₉₉)		Доза: 0,6 мг/кг		Доза: 0,3 мг/кг	
PID	Мышей в группе	Снижение вирусной нагрузки (%)	mAb [нг/мл]	Снижение вирусной нагрузки (%)	mAb [нг/мл]
			Сыворотка		Сыворотка
Контроль I	5	>99	8451,9 ± 2562	96,9	3129,7 ± 403

НО: Не определено

Таблица 7е

Эксп. М4 (ED ₉₉)		Доза: 0,15 мг/кг		Доза: 0,05 мг/кг	
PID	Мышей в группе	Снижение вирусной нагрузки (%)	mAb [нг/мл]	Снижение вирусной нагрузки (%)	mAb [нг/мл]
			Сыворотка		Сыворотка
H1N3592P3	5	>99	1578,9 ± 256	90,6	524,0 ± 42
Контроль I	5	57,9	1561,2 ± 282	24,2	547,5 ± 59
Контроль II	5	96,7	1566,0 ± 354	48,5	465,7 ± 85
Изотип. контр.	5	Нет данных	1406,0 ± 196	Нет данных	375,3 ± 86

НО: Не определено

В. Модель с хлопковыми хомяками

Для исследований *in vivo* нейтрализации РСВ, в которых использовали хлопковых хомяков, выбрали типовые антитела H1N3627N и H1N3592P3. Вкратце, хлопковым хомякам в возрасте 6-8 недель (n=5) проводили ВМ инъекцию в двух дозировках (5 или 0,6 мг/кг), применяя H1N3627N, H1N3592P3, контроль I, контроль II или изотипически сходное антитело.

Через один день после инъекции хомяков стимулировали интраназальным путем 100 мкл (10⁵ БОЕ) штамма РСВ А2. Через четыре дня после инфицирования брали образцы сыворотки крови, хомяков умерщвляли, а легкие и назальные ткани изымали для проведения титрования вируса. Легочные гомогенаты центрифугировали для удаления продуктов клеточного распада, а часть супернатанта использовали для определения концентрации анти-РСВ-F mAb в легких. Оставшийся супернатант использовали для проведения серийных разведений, которые инкубировали с клетками HEp-2 на протяжении 2 ч, чтобы дать возможность вирусу попасть в клетки. После этого супернатант удаляли, а клетки покрывали 1% метилцеллюлозой. Через шесть дней клетки окрашивали, подсчитывали бляшки и рассчитывали log₁₀ снижения вирусной нагрузки по сравнению с изотипическим контролем.

Типовое антитело H1N3592P3 оказалось более эффективным в снижении вирусной нагрузки в легких и носовой полости, чем контроль I, и таким же эффективным как контроль II в случае легких и более эффективным в случае носовой полости. Типовое антитело H1N3627N оказалось более эффективным,

чем контроль I, и таким же эффективным как контроль II в случае носовой полости (табл.8). В частности, при дозировке 5 мг/кг антитела Н1Н3627N, Н1Н3592Р3, контроль I и контроль II все эффективно снижали степень РСВ-инфекции в легких практически до неопределяемого уровня по сравнению с контролем (кратность изменения $\log(10)$ снижения вирусной нагрузки $\geq 2,33$). При этом в носовой полости была очевидной большая разница в эффективности нейтрализации между Н1Н3627N, Н1Н3592Р3, контролем II по сравнению с контролем I. Н1Н3592Р3 демонстрировало большее снижение вирусной нагрузки (2,65 \log) по сравнению с Н1Н3627N (1,46 \log) или контролем II (1,33 \log).

При более низкой вводимой дозе в случае легких была очевидной большая разница в эффективности нейтрализации между тремя антителами по сравнению с контролем I. При 0,6 мг/кг Н1Н3592Р3 демонстрировало сходное снижение вирусной нагрузки с контролем (1,5 \log), и они оба были более эффективны, чем контроль I (0,624 \log). Н1Н3627N демонстрировало меньшую эффективность по сравнению с тремя другими антителами.

Затем было выбрано типовое анти-РСВ-F антитело Н1Н3592Р3 для исследования его способности нейтрализовать РСВ подтипа В in vivo на модели с хлопковыми хомяками. Как и в случае РСВ/А, 6-8-недельным хлопковым хомякам ($n = 4$ -6/группу/эксперимент) внутримышечно вводили 5 или 0,6 мг/кг Н1Н3592Р3, контроль I или контроль II. На следующий день животных стимулировали 10^5 БОЕ РСВ/В штамма 18537. Через четыре дня после стимуляции определяли титры вируса в легких и носовой полости, а также титры антител в сыворотке. Результаты, приведенные в табл. 9, представляют собой данные, объединенные по двум независимым экспериментам.

Н1Н3592Р3 демонстрировало эффективность в снижении вирусной нагрузки РСВ/В в легких как при высокой, так и при низкой дозах (табл. 9). При 5,0 мг/кг вирусная нагрузка РСВ/В в легких была снижена в 2,21 \log в случае Н1Н3592Р3 по сравнению со снижением, составившим 2,11 \log в случае контроля I и 2,18 \log в случае контроля II. При 0,6 мг/кг вирусная нагрузка РСВ/В в легких была снижена в 1,29 \log в случае Н1Н3592Р3 по сравнению со снижением, составившим 0,75 \log в случае контроля I и 0,83 \log в случае контроля II.

В общем случае Н1Н3592Р3 демонстрировало превосходство в нейтрализации РСВ подтипа В в легких по сравнению контролем I и II при 0,6 мг/кг. При 5 мг/кг Н1Н3592Р3 демонстрировало сопоставимую с контролем I и контролем II нейтрализующую способность в снижении вирусной нагрузки в легких.

Результаты свидетельствуют о том, что Н1Н3592Р3 является эффективным нейтрализатором штаммов РСВ подтипа А и В in vivo в случае хлопковых хомяков, более эффективно нейтрализуя РСВ-инфекцию при высоких дозах в носовой полости и при низких дозах - в легких. Эффективность при более низких дозах указывает на возможность применения режима с более низкими дозами в клинических условиях.

Таблица 8. Снижение вирусной нагрузки РСВ-А ($\log(10)$) у хлопковых хомяков после введения анти-РСВ-F антител

Эксп. R1	Хомяков в группе	Доза: 0,6 мг/кг			Доза: 5,0 мг/кг		
		Снижение вирусной нагрузки легкие ($\log(10)$)	Снижение вирусной нагрузки нос ($\log(10)$)	mAb [нг/мл] Сыворотка День 4	Снижение вирусной нагрузки легкие ($\log(10)$)	Снижение вирусной нагрузки нос ($\log(10)$)	mAb [нг/мл] Сыворотка День 4
Н1Н3627N	5	0,34	0,22	3,43 ± 0,25	2,33	1,46	21,52 ± 5,47
Н1Н3592Р3	5	1,66	0,19	3,49 ± 0,55	2,56	2,66	46,28 ± 7,69
Контроль I	5	0,62	0,21	3,04 ± 0,29	2,37	1,07	39,95 ± 5,23
Контроль II	5	1,50	0,20	4,26 ± 0,66	2,55	1,33	24,06 ± 2,96
Изотип. контр.	4	Нет данных	Нет данных	3,78 ± 0,99	Нет данных	Нет данных	30,43 ± 6,66

Таблица 9. Снижение вирусной нагрузки РСВ-В ($\log(10)$) у хлопковых хомяков после введения анти-РСВ-F антител

Эксп. R2	Хомяков в группе	Доза: 0,6 мг/кг			Доза: 5,0 мг/кг		
		Снижение вирусной нагрузки легкие (\log_{10})	Снижение вирусной нагрузки нос (\log_{10})	mAb [нг/мл] Сыворотка День 4	Снижение вирусной нагрузки легкие (\log_{10})	Снижение вирусной нагрузки нос (\log_{10})	mAb [нг/мл] Сыворотка День 4
Н1Н359 2Р3	10	1,29	0,21	3,89 ± 0,99	2,21	0,86	42,31 ± 13,5
Контроль I	11	0,75	0,15	3,87 ± 0,73	2,11	0,79	35,28 ± 11,8
Контроль II	11	0,83	0,10	3,75 ± 0,49	2,18	1,24	27,65 ± 7,49
Изотип. контр.	10	Нет данных	Нет данных	3,56 ± 1,17	Нет данных	Нет данных	34,28 ± 9,24

С. Модель с хлопковыми хомяками - определение ED₉₉ для типового антитела Н1Н3592Р3

На хлопковых хомяках проводили исследования с определенным диапазоном дозировок, чтобы определить, при какой дозировке типовое антитело Н1Н3592Р3 будет снижать вирусную нагрузку на >99% (т.е., ED₉₉). Хлопковым хомякам профилактически вводили ВМ дозу Н1Н3592Р3 контрольного антитела 1, составляющую 10, 5, 2,5, 1,25 или 0,62 мг/кг. Дополнительно в этом исследовании проводили дозирование изотипическим контрольным антителом при 10 или 0,62 мг/кг, чтобы выделить активные агенты. После обработки антителом проводили интраназальную стимуляцию РСВ подтипа А (штамм РСВ А2) или подтипа В (штамм РСВ В 18537). Через четыре дня после инфицирования брали образцы сыворотки крови, хомяков умерщвляли, а легкие изымали для проведения титрования вируса. Н1Н3592Р3 в дозировке 0,62 мг/кг обеспечивало >99% снижение вирусной нагрузки в легких по сравнению с контролем 1, которому для достижения такого же >99% снижения вирусной нагрузки требовалась доза в 2,5 мг/кг (табл. 10). Средняя конечная концентрация контроля 1 (27 мкг/мл) при рассчитанной величине ED₉₉ хорошо коррелировала с опубликованной ранее работой (Scott and Lamb, 1999), что свидетельствует о том, что концентрация паливизумаба в сыворотке крови (т.е., контроля 1), составляющая 30-40 мкг/мл во время РСВ-инфекции, была связана с 99% снижением вирусной нагрузки в легких. Средняя конечная концентрация Н1Н3592Р3 (4,9 мкг/мл) хорошо коррелировала со сниженной в 4 раза доставляемой дозой, которая соответствовала ED₉₉. Результаты в случае стимуляции подтипом В были сходными (табл. 11) в том, что ED₉₉ для Н1Н3592Р3 достигалась при 2,5 мг/кг, в то время как для контроля 1 требовалась примерно в 4 раза большая доза (10 мг/кг), чтобы получить такое же >99% снижение вирусной нагрузки.

Таким образом, эти исследования подтверждают, что менее частое дозирование Н1Н3592Р3 может обеспечивать такой же уровень защиты, что и установленная на сегодня дозировка паливизумаба.

Таблица 10. Определение ED₉₉ для анти-PCB-F антител после стимуляции PCB подтипа А

Определение ED ₉₉ с PCB подтипа А					
% снижения вирусной нагрузки					
PID	10 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	1,25 мг/кг	0,62 мг/кг
Н1Н3592Р3	>99	>99	>99	>99	>99
Контроль I	>99	>99	>99	98,9	95,9
Изотип. контр.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Концентрация антитела в сыворотке крови (мкг/мл)					
Н1Н3592Р3	107,2 ±3,4	48,44 ±6,1	20,15 ±1,8	10,55 ±1,5	4,91 ±0,7
Контроль I	89,16 ±6,5	58,07 ±6,3	26,93 ±3,3	12,72 ±2,2	6,65 ±0,5
Изотип. контр.	90,57 ±12,6	--	--	--	5,39 ±0,5

Таблица 11. Определение ED₉₉ для анти-PCB-F антител после стимуляции PCB подтипа В

Определение ED ₉₉ с PCB подтипа В					
% снижения вирусной нагрузки					
PID	10 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	1,25 мг/кг	0,62 мг/кг
Н1Н3592Р3	>99	>99	>99	98,4	96,7
Контроль I	>99	97,7	98,4	96,3	88,2
Изотип. контр.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Концентрация антитела в сыворотке крови (мкг/мл)					
Н1Н3592Р3	98,04 ±18,4	50,99 ±7,8	27,82 ±4,9	10,49 ±1,7	7 ±0,3
Контроль I	98,89 ±10,9	42,74 ±8,9	26,46 ±3,3	16,06 ±2,2	7,58 ±1,1
Изотип. контр.	99,72 ±17,4	Нет данных	Нет данных	Нет данных	5,38 ±0,5

Получали различные биспецифические антитела для применения в практической реализации способов согласно изобретению. Например, получали специфические в отношении PCB-F антитела в биспецифической конструкции ("биспецифики"), в которой переменные области, связывающиеся с разными доменами белка PCB-F, соединены вместе, чтобы обеспечить двухдоменную специфичность в пределах одной связывающей молекулы. Сконструированные соответствующим образом биспецифики могут усиливать общую эффективность нейтрализации вируса путем повышения как специфичности, так и авидности связывания. Переменные области, обладающие специфичностью в отношении отдельных доменов, спарены на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере в случае биспецифика переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы, обладающей специфичностью в отношении одного домена, соединены с переменными областями легкой цепи (V_L) из группы связывающих молекул, обладающих специфичностью в отношении второго домена, для определения некогатных V_L-партнеров, которые можно спаривать с оригинальной V_H, не нарушая оригинальную специфичность в отношении этой V_H. Таким образом, один V_L-сегмент (например, V_{L1}) можно комбинировать с двумя разными V_H-доменами (например, V_{H1} и V_{H2}), чтобы получить биспецифик, содержащий два связывающих "плеча" (V_{H1}-V_{L1} и V_{H2}-V_{L1}). Применение одного V_L-сегмента снижает сложность системы и, тем самым, упрощает и повышает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, применяемых при получении биспецифика (См., например, USSN 13/022759 и US 2010/0331527).

В альтернативном варианте антитела, которые связывают PCB-F и вторую мишень, такие как, без ограничений, например, второе отличное анти-PCB-F антитело или токсид, или вакцина, можно приготовить в биспецифической конструкции при помощи описанных в данном документе методов или других известных специалистам в данной области техники методов. Переменные области антитела, связывающиеся с разными областями, можно соединять с переменными областями, которые связываются с соответствующими участками, например, отличным вирусным антигеном, чтобы обеспечить для одной

связывающей молекулы специфичность в отношении двух антигенов. Сконструированные соответствующим образом биспецифики такого типа выполняют двойную функцию. Например, в случае биспецифического антитела, которое связывает РСВ-F и РСВ-G, оно будет способно лучше нейтрализовать вирус без необходимости введения композиции, содержащей два отдельных антитела. Вариабельные области, обладающие специфичностью в отношении РСВ-F, комбинируют с вариабельной областью со специфичностью в отношении РСВ-G и спаривают на структурном каркасе, что позволяет каждой вариабельной области связываться с отдельными антигенами.

Биспецифические связывающие молекулы исследуют в отношении связывания и функционального блокирования антигенов-мишеней, например, РСВ-F и РСВ-G, при помощи любого из описанных выше методов анализа для антител. Например, для оценки биспецифического взаимодействия применяют стандартные методы для определения связывания растворимого белка, такие как *Biacore*, ELISA, эксклюзионная хроматография, мультиугловое рассеяние лазерного излучения, прямую сканирующую калориметрию и другие методы. Связывание биспецифических антител с РСВ-F и РСВ-G определяют методом анализа связывания ELISA, в котором синтетические пептиды, представляющие разные антигены, наносят на лунки микротитровальных планшетов и определяют связывание биспецифика, используя вторичное детекторное антитело. Эксперименты для определения связывания также можно проводить, используя метод поверхностного плазмонного резонанса, в котором в режиме реального времени определяют взаимодействие связывания пептида с антителом путем пропускания потока пептида или биспецифика через поверхность сенсора, на которой захвачен, соответственно, биспецифик или пептид. Функциональное *in vitro* блокирование биспецификом РСВ-F и РСВ-G определяют при помощи метода биоанализа, такого как описанный в данном документе анализ нейтрализации, или при помощи исследований *in vivo* защиты на соответствующих животных моделях, таких как описанные в данном документе, или на *in vivo* модели воспаления легких.

Пример 7. *In vitro* получение РСВ-ускользающих мутантов для определения эпитопа связывания Н1Н3592Р3

Получение ускользающих мутантов к Н1Н3592Р3

3×10^5 Нер-2 клеток/на лунку высевали в 6-луночный планшет на 24 ч. Концентрации Н1Н3592Р3 в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,016 мкг/мл смешивали со штаммом РСВ подтипа А 1540 или штаммом РСВ подтипа В 1580 на протяжении 1 ч при 37°C. После совместной инкубации смесь РСВ/антитело добавляли в предварительно засеянные клетки Нер-2 при множественности инфицирования (МИ), составлявшей 10 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/клетку. Клетки инкубировали на протяжении 6 дней и ежедневно отслеживали цитопатический эффект при помощи оптической микроскопии. На 6 день собирали содержимое каждой лунки, доводили до начальной концентрации антитела и применяли для инфицирования свежесезянных клеток Нер-2. Этот серийный пассаж повторяли до наблюдения очевидного цитопатического эффекта при высоких концентрациях Н1Н3592Р3 (50 мкг/мл), что приблизительно на 2 log превышает IC_{50} антитела, предполагая наличие вирусных мутантов. Супернатанты из этих лунок подтверждали по наличию устойчивого вируса при помощи анализа микронейтрализации (описанного ниже), а выделение бляшек проводили в 10 см чашках для тканевого культивирования. 10 отдельных бляшек распределяли по 6-луночным планшетам и повторно исследовали вирус на предмет устойчивости методом микронейтрализации. Затем проводили секвенирование этих вирусных мутантов.

Анализ микронейтрализации

Чтобы подтвердить, что ускользающие мутанты, полученные под давлением Н1Н3592Р3, были устойчивы к нейтрализации, проводили анализ микронейтрализации в клетках Нер-2. Вкратце, 10^5 клеток Нер2, культивируемых в среде DMEM 1x, дополненной 5% Nuclone ФБС, L-глутамином и антибиотиками, высевали в 96-луночные черные микропланшеты с прозрачным дном и инкубировали на протяжении 16-18 ч (37°C, 5% CO₂).

Далее различные концентрации антител, начиная с 666 нМ, разведенные 1:5 в среде, инкубировали с РСВ дикого типа (подтипа А или В) или ускользающими мутантами обоих подтипов А и В при МИ от 0,04 до 0,4 на протяжении 2 ч (37°C, 5% CO₂). Были включены контрольные образцы, не содержащие вирус, или контрольные образцы, содержащие вирус, но не содержащие антител. После разведения антитела исследовали в двух параллельных экспериментах. После инкубации смесь антитело/вирус добавляли к клеткам и поддерживали процесс инфицирования на протяжении 3 дней. Степень инфицирования определяли, фиксируя клетки в 2% ПФА и проводя ELISA с козьими анти-РСВ/анти-козьими, конъюгированными с пероксидазой хрена антителами. В лунки добавляли люминесцентные реагенты и регистрировали сигнал при помощи планшет-ридера (Victor X3, Perkin Elmer). Величины люминесценции анализировали при помощи трехпараметрического логистического уравнения для 11-точечной кривой (GraphPad Prism).

Результаты

Получали ускользающие мутанты респираторного синцитиального вируса, чтобы локализовать специфическую область связывания Н1Н3592Р3 с РСВ-F. Вкратце, клетки Нер-2, инфицированные штаммами РСВ 1540 (подтип А) или 1580 (подтип В), подвергали обработке Н1Н3592Р3 в диапазоне от

50 до 0,016 мкг/мл. Через 6 дней содержимое каждой лунки применяли для инфицирования свежесезонных клеток HEp-2. Этот серийный пассаж повторяли до наблюдения в клетках HEp-2 цитопатического эффекта даже в присутствии самой высокой дозы антитела, что свидетельствует о наличии РСВ-вирусных мутантов, полученных при селекционном давлении. В общем случае выделяли вирусные мутанты из десяти разных бляшек, подтвержденных в отношении нейтрализационной устойчивости в присутствии H1N3592P3, и после этого проводили их секвенирование.

Анализ последовательностей подтвердил, что ускользящие по отношению к H1N3592P3 мутанты были обнаружены на аминокислотных позициях 173 и 174 (S173Y и T174K) РСВ-F (SEQ ID NO: 354), что свидетельствует о том, что эти аминокислоты играют важную роль в связывании антитела и нейтрализации вируса. В предыдущих исследованиях определили, что эпитопы связывания для анти-РСВ контрольного I и контрольного II антител расположены между S255 - N276. Данные этих исследований позволяют определить участок связывания H1N3592P3 на РСВ-F, который играет основную роль в нейтрализации вируса (смотрите табл. 12) и отличается от того, который необходим в случае ранее установленных контрольных антител.

Таблица 12. Эффективность нейтрализации H1N3592P3 и контрольных анти-РСВ антител в случае штаммов РСВ подтипа А и В и родственных ускользящих мутантов

Вирус	H1N3592P3 (IC50, пМ)	Контроль I (IC50, пМ)	Контроль II (IC50, пМ)
Дт подтип А (РСВ/А)	177	1140	108
РСВ/А S173Y	Устойчивый	1710	170
Дт подтип В (РСВ/В)	290	1900	260
РСВ/В S173T	Устойчивый	1900	177
РСВ/В T174K	Устойчивый	640	108
РСВ/В S173T/T174K	Устойчивый	980	218

Пример 8. Определение эпитопа связывания H1N3592P3 с РСВ-F при помощи водородно-дейтериевого обмена и масс-спектрометрии

Проводили водородно-дейтериевый обмен (H/D обмен) в комбинации с пептическим расщеплением и масс-спектрометрией для определения эпитопа связывания анти-РСВ-F антитела H1N3592P3 к рекомбинантному РСВ-F. Применяли два формата H/D обмена: способ "прямой-раствор/обратный-гранулы", в котором фрагменты пептида РСВ-F, защищенные H1N3592P3 от обратного обмена, сохраняют D₂O и согласно данным масс-спектроскопии имеют на выходе большие молекулярные массы (соотношения масса/заряд), и контрольный способ "прямой-гранулы/обратный-гранулы", который устанавливает базовые соотношения масса/заряд для всех пептидов РСВ-F. Вычитание контрольных соотношений масса/заряд из соотношений масса/заряд, полученных способом "прямой-раствор/обратный-гранулы", позволяет выделить определенные аминокислотные участки, которые демонстрируют ненулевую разницу соотношений масса/заряд, т.е., остаточный D₂O, который соответствует эпитопу связывания между H1N3592P3 и РСВ-F.

Способы

Формат "прямой-раствор/обратный-гранулы"

В формате "прямой-раствор/обратный-гранулы" (прямой обмен в растворе, за которым следует обратный обмен на гранулах) белок RSV-F.mmh (SEQ ID NO: 353) дейтерировали на протяжении 5 мин или 10 мин в ФСБ-буфере, приготовленном с D₂O, а затем связывали с H1N3592P3, ковалентно присоединенным к N-гидроксисукцинимидным (NHS) арагозным гранулам (GE Lifescience) путем 2-минутной инкубации. Комплекс РСВ-F/гранулы H1N3592P3 промывали ФСБ-буфером (приготовленным с недеирированной H₂O) и инкубировали в ФСБ-буфере на протяжении половины времени прямого обмена. После обратного обмена связанный РСВ-F элюировали с гранул при помощи охлажденного до температуры заморозки раствора ТФУ с низким рН. Затем элюированный РСВ-F расщепляли иммобилизованным пепсином (Thermo Scientific) на протяжении 5 мин. Полученные в результате пептиды обессаливали при помощи хроматографических микродозаторов ZipTip и без промедления анализировали при помощи время-пролетной ионизации лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF)-время-пролетной (TOF) масс-спектрометрии (MS) UltrafleXtreme.

Формат "прямой-гранулы/обратный-гранулы"

В формате "прямой-гранулы/обратный-гранулы" (прямой обмен на гранулах, за которым следует обратный обмен на гранулах) RSV-F.mmh (SEQ ID NO: 353) сначала связывали с H1N3592P3 арагозными гранулами, а затем инкубировали на протяжении 5 или 10 мин в D₂O для прямого обмена. Комплекс РСВ-F/гранулы H1N3592P3 промывали ФСБ-буфером (приготовленным с недеирированной H₂O) и

инкубировали в ФСБ-буфере на протяжении половины времени прямого обмена. После обратного обмена связанный РСВ-F элюировали с гранул при помощи охлажденного до температуры замерзания раствора ТФУ с низким рН. Затем элюированный РСВ-F расщепляли иммобилизованным пепсином (Thermo Scientific) на протяжении 5 мин. Полученные в результате пептиды обессаливали при помощи хроматографических микродозаторов ZipTip и без промедления анализировали при помощи MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрии. Рассчитывали центроидные величины или средние соотношения массы к заряду (масса/заряд) всех выявленных пептидов и сравнивали между этим экспериментом и экспериментом "прямой-раствор/обратный-гранулы".

Определение пептидов

Определение пептидов проводили при помощи жидкостной хроматографии Orbitrap Elite (Thermo Scientific).

Результаты

В табл.13 приведено детальное сравнение разницы соотношений масса/заряд для всех пептидов РСВ-F, выявленных методом MALDI-TOF масс-спектрометрии после H/D обмена и пептического расщепления. Два сегмента, соответствующие аминокислотам 161-171 (EGEVNKKIKSAL, (SEQ ID NO: 355)) и 172-188 (LSTNKAVVLSNGVSVL, (SEQ ID NO: 356)) из SEQ ID NO: 354, характеризовались разницей центроидных величин выше 0,20 - эталонный наблюдаемый порог, который, как считается, указывает на наличие контакта антитело-белок и, следовательно, на область эпитопа. Также стоит отметить, что сигнал пептида, соответствующий аминокислотам 161-171 не оценивали количественно для 10-минутного эксперимента с прямым обменом из-за низкого уровня сигнала и шума. При этом величина разницы в 0,88, зарегистрированная для 5-минутного эксперимента с прямым обменом, намного превышает пороговое значение в 0,2 и может быть объяснена существенным изменением скорости H/D обмена после связывания РСВ-F с H1N3592P3.

Кроме того, пептидный сегмент, соответствующий аминокислотам 172-188, содержит аминокислоты двух ускользящих мутантов РСВ (S173Y и T174K; смотрите пример 7), которые были устойчивы к обработке H1N3592P3, что свидетельствует о том, что эти две аминокислоты играют роль в связывании антитела и нейтрализации вируса. Таким образом, комбинация секвенирования ускользящих мутантов РСВ вместе с H/D обменом дает основание полагать аминокислоты 161-188 из SEQ ID NO: 354 как определяющие, по меньшей мере частично, участок связывания антитела H1N3592P3 в РСВ-F.

Таблица 13. Центроидные (масса/заряд) величины для пептически расщепленных пептидов РСВ-F после обратного обмена после дейтерирования в отсутствие (прямой-раствор/обратный-гранулы) и присутствии (прямой-гранулы/обратный-гранулы) H1N3592P3

Остатки	Эксперимент I			Эксперимент II		
	обмен: 5 мин прям/2,5 мин обр			обмен: 10 мин прям/5 мин обр		
	прям-гранулы/обр-гранулы (масса/заряд)	прям-раствор/обр-гранулы (масса/заряд)	разница	прям-гранулы/обр-гранулы (масса/заряд)	прям-раствор/обр-гранулы (масса/заряд)	разница
46-52	791,06	791,10	0,04	791,06	791,15	0,09
48-56	1083,32	1083,37	0,05	1083,32	1083,35	0,03
48-58	1297,42	1297,44	0,02	1297,40	1297,44	0,04
79-92	1665,81	1665,96	0,15	1665,86	1665,89	0,03
94-107	1519,93	1520,00	0,06	1520,01	1520,09	0,07

96-107	1278,64	1278,61	-0,03	1278,61	1278,73	0,12
96-108	1434,61	1434,60	-0,01	1434,50	1434,63	0,13
148-160	1308,97	1309,12	0,16	Нет данных	Нет данных	Нет данных
161-171	1188,72	1189,60	0,88	Нет данных	Нет данных	Нет данных
172-188	1689,44	1691,68	2,24	1689,60	1691,07	1,47
220-230	1390,02	1390,06	0,04	1389,98	1389,93	-0,05
220-232	1632,30	1632,34	0,04	1632,29	1632,37	0,08
223-230	1048,49	1048,54	0,05	1048,44	1048,55	0,11
223-232	1291,16	1291,21	0,05	1291,12	1291,18	0,07
231-236	760,95	760,95	0,00	761,02	760,95	-0,06
233-240	966,29	966,33	0,04	966,20	966,30	0,09
233-249	1780,20	1780,39	0,19	1780,38	1780,38	0,00
261-277	1977,81	1977,91	0,10	1977,92	1977,80	-0,13
261-279	2205,05	2205,12	0,07	2205,10	2205,20	0,10
278-285	958,20	958,34	0,14	958,15	958,29	0,14
278-286	1121,50	1121,57	0,07	1121,54	1121,59	0,05
278-289	1453,19	1453,16	-0,03	1453,14	1453,08	-0,06
280-286	894,20	894,22	0,02	894,29	894,28	-0,02
280-289	1225,75	1225,80	0,05	1225,79	1225,81	0,02
280-290	1312,70	1312,70	-0,01	1312,86	1312,74	-0,13
457-467	1329,73	1329,82	0,09	1329,73	1329,76	0,03
468-477	1180,57	1180,67	0,10	1180,60	1180,42	-0,18
527-545	2132,30	2132,32	0,02	2132,39	2132,38	-0,01
534-545	1318,54	1318,54	0,00	1318,64	1318,50	-0,13
537-545	988,92	988,87	-0,05	988,93	988,84	-0,08
546-557	1528,62	1528,68	0,07	1528,64	1528,64	0,00
Her ID	743,16	743,06	-0,10	743,10	742,99	-0,11
Her ID	844,01	843,98	-0,03	844,03	843,96	-0,07
Her ID	901,26	901,40	0,13	901,36	901,40	0,04
Her ID	943,15	943,19	0,04	943,24	943,20	-0,04
Her ID	1090,41	1090,45	0,04	1090,48	1090,51	0,03
Her ID	1143,51	1143,61	0,10	1143,53	1143,57	0,04
Her ID	1325,52	1325,56	0,04	1325,54	1325,66	0,12
Her ID	1353,69	1353,64	-0,06	1353,77	1353,61	-0,16
Her ID	1550,39	1550,44	0,05	1550,45	1550,40	-0,05
Her ID	2074,49	2074,41	-0,08	2074,52	2074,36	-0,15
Her ID	2257,71	2257,70	-0,01	2257,89	2257,85	-0,04
Her ID	2365,83	2365,72	-0,12	2365,94	2365,87	-0,07
Her ID	2385,18	2385,17	-0,01	2385,23	2385,25	0,02
Her ID	2405,22	2405,09	-0,12	2405,17	2405,15	-0,02
Her ID	2456,18	2456,24	0,07	2456,14	2456,09	-0,05
Her ID	2513,28	2513,26	-0,01	2513,32	2513,19	-0,14

Пример 9. Антитела к белку слияния респираторного синцитиального вируса (РСВ-F) демонстрируют эффективную нейтрализующую способность в случае лабораторных штаммов РСВ подтипа А и В H1N3592P3 и контрольные антитела I и II исследовали методом микронейтрализации РСВ для определения эффективности. Вкратце, 10^4 клеток HEp-2, культивируемых в среде DMEM 1x, дополненной

5% Nucleon ФБС, L-глутамином и антибиотиками, высевали в 96-луночные черные микропланшеты с прозрачным дном и инкубировали на протяжении 16-18 часов (37°C, 5% CO₂). Далее различные концентрации антител, начиная с 666 нМ, с последующими разведениями 1:5 в среде, инкубировали с различными лабораторными штаммами РСВ подтипа А, предоставленными АТСС, при МИ 0,042 на протяжении 2 ч (37°C, 5% CO₂). Были включены не содержащие вируса и нерелевантные контрольные образцы.

После инкубации смесь антитело:вирус добавляли к клеткам HEp-2 и поддерживали процесс инфицирования на протяжении 3 дней. Степень инфицирования определяли, фиксируя клетки в 2% ПФА и проводя ELISA с козьими анти-PCV/анти-козьими, конъюгированными с пероксидазой хрена антителами. В лунки добавляли люминесцентные реагенты и регистрировали сигнал при помощи планшет-ридера (Victor X3, Perkin Elmer). Величины люминесценции анализировали при помощи трехпараметрического логистического уравнения для 11-точечной кривой (GraphPad Prism).

Антитела согласно изобретению демонстрировали широкий диапазон нейтрализующих активностей против лабораторных штаммов РСВ (табл. 14). Антитела H1N3592P3 и AM22 демонстрировали сходную с контролем II эффективность в случае лабораторных штаммов РСВ подтипа А. По сравнению с контролем I H1N3592P3 оказалось в 15-17 раз более эффективным (IC50 44-140 пМ), в то время как AM22 оказалось в 9-23 раз более эффективным (IC50 86-91 пМ) (табл. 14). В случае подтипа В антитело H1N3592P3 демонстрировало сходную с контролем II эффективность, которая превышала эффективность AM22 и контроля I. По сравнению с контролем I, H1N3592P3 оказалось в 2-5 раз более эффективным (IC50 33-230 пМ), в то время как AM22 оказалось в 0,13-2 раза более эффективным (IC50 190-2508 пМ).

Этот пример демонстрирует эффективность антител согласно данному изобретению в нейтрализации нескольких лабораторных штаммов РСВ обоих подтипов -А и В - in vitro, которая превышает эффективность, демонстрируемую ранее стандартными контрольными антителами.

Таблица 14

Подтип/штамм	H1N3592P3 IC50 (нМ)	Контроль I IC50 (нМ)	Контроль II IC50 (нМ)	Контроль III IC50 (нМ)
A/A2	140	2080	202	91
A/Длин.	44	752	83	86
B/18537	230	1190	187	660
B/1400	33	113	38	190
B/1A2	48	223	40	580
B/9320	151	338	76	2508

Пример 10. Антитела к белку слияния респираторного синцитиального вируса (PCV-F) демонстрируют эффективную нейтрализующую способность в случае клинических изолятов РСВ подтипа А

H1N3592P3 и контрольные антитела I, II и III исследовали методом микронейтрализации РСВ для определения эффективности. Вкратце, 10⁴ клеток HEp-2, культивируемых в среде DMEM 1x, дополненной 5% Nucleon ФБС, L-глутамином и антибиотиками, высевали в 96-луночные черные микропланшеты с прозрачным дном и инкубировали на протяжении 16-18 ч (37°C, 5% CO₂). Далее, различные концентрации антител, начиная с 666 нМ, с последующими разведениями 1:5 в среде, инкубировали с различными клиническими изолятами РСВ подтипа А, предоставленными Dr. Moore (Emory University), при МИ в диапазоне от 0,015 до 0,128 на протяжении 2 ч (37°C, 5% CO₂). Были включены не содержащие вируса и нерелевантные контрольные образцы.

После инкубации смесь антитело:вирус добавляли к клеткам HEp-2 и поддерживали процесс инфицирования на протяжении 3 дней. Степень инфицирования определяли, фиксируя клетки в 2% ПФА и проводя ELISA с козьими анти-PCV/анти-козьими, конъюгированными с пероксидазой хрена антителами. В лунки добавляли люминесцентные реагенты и регистрировали сигнал при помощи планшет-ридера (Victor X3, Perkin Elmer). Величины люминесценции анализировали при помощи трехпараметрического логистического уравнения для 11-точечной кривой (GraphPad Prism).

Антитела согласно изобретению демонстрировали широкий диапазон нейтрализующих активностей против клинических изолятов РСВ (табл. 15). Антитело H1N3592P3 демонстрировало сходную с контролями II и III эффективность в случае большинства клинических изолятов. По сравнению с контролем I, H1N3592P3 оказалось в 10-22 раз более эффективным (IC50 34-66 пМ) (табл. 15).

Этот пример демонстрирует эффективность антител согласно данному изобретению в нейтрализации нескольких клинических изолятов РСВ in vitro, которая превышает эффективность, демонстрируемую ранее стандартными контрольными антителами.

Таблица 15. Антитела к PCV-F демонстрируют эффективную нейтрализующую способность в

случае клинических изолятов РСВ подтипа А

	МИ	Н1Н3592Р3 IC50 (нМ)	Контроль	Контроль	Контроль	Genbank
			I IC50 (нМ)	II IC50 (нМ)	III IC50 (нМ)	
A2001/2-20	0,016	43	935	74	72	JX069798.1
A2001/3-12	0,018	66	1259	129	60	JX069799.1
A1997/12-35	0,015	40	478	41	20	JX069800.1
A1998/3-2	0,128	35	344	36	31	JX069801.1
A1998/12-21	0,026	34	580	68	43	JX069802.1
A2000/3-4	0,040	50	899	88	55	JX069803.1

Пример 11. Н1Н3592Р3 блокирует попадание вируса в клетку путем ингибирования слияния вируса с клеточными мембранами

Проводили исследование, чтобы определить механизм блокирования антителами согласно изобретению инфекции, вызываемой респираторным синцитиальным вирусом (РСВ). Исследовали одно типовое антитело согласно изобретению - Н1Н3592Р3, чтобы определить, действует ли оно таким образом, чтобы предотвращать/ингибировать слияние РСВ с клетками-хозяевами (фиг. 2А и 2В). Механизм действия контроля I (служащее положительным контролем mAb на основе последовательности паливизумаба) описывался ранее как ингибирование вирусного слияния с клеткой-хозяином (Huang et al., J. of Virol., (2010), Aug. 84(16): 8132-40). Так как РСВ-Ф участвует как в присоединении к клетке посредством взаимодействия с рецептором хозяина нуклеолином, так и в слиянии вирусной и плазматической мембран, проводили анализ, чтобы определить механизм действия Н1Н3592Р3.

Анализ присоединения (фиг. 2А) проводили путем инкубации РСВ (подтип А, штамм А2) в присутствии Н1Н3592Р3 или служащего положительным контролем антитела (контроль I), а затем инкубируя смесь с клетками Нер-2 при 4°C на протяжении одного часа, чтобы обеспечить возможность связывания вируса с клетками. Несвязанный вирус вымывали, клетки фиксировали, а процентное содержание присоединенного вируса определяли методом ELISA. Гепарин, который блокирует присоединение РСВ, использовали в качестве контроля.

Вирусное слияние выявляли, обеспечивая возможность вирусного присоединения при 4°C, вымывая несвязанный вирус, затем инкубируя с Н1Н3592Р3, положительным контролем I или изотипическим отрицательным контрольным антителом при 4°C и повышая температуру клеток до 37°C, чтобы стимулировать вирусное слияние и попадание в клетки. Наличие вирусной инфекции определяли через 3 дня методом ELISA (фиг. 2В).

ОЛЕ: Относительные люминесцентные единицы.

Н1Н3592Р3, как и контроль I, блокирует слияние РСВ, но не присоединение РСВ к клеточной поверхности, в то время как изотипическое (отрицательное) контрольное mAb не оказывало влияние на вирусное слияние (фиг. 2В). Гепарин эффективно блокирует присоединение РСВ к клеткам (Hallack et al., Virology (2000), 271(2):264-75), но ни одно антитело не ингибирует присоединение РСВ (фиг. 2А). Н1Н3592Р3 блокировало вирусное слияние в этом формате анализа с IC50, составлявшей 230 пМ, в то время как положительное контрольное mAb (контроль I) блокировало вирусное слияние в этом формате анализа с IC₅₀ 1 нМ (фиг. 2В). Сходные результаты наблюдали для штамма РСВ подтипа В (данные не приведены).

Пример 12. Определение перекрестного конкурирования анти-РСВ-Ф антител за связывание РСВ-Ф при помощи системы Octet

Конкурентное связывание для панели анти-РСВ-Ф mAb определяли при помощи биослоевой интерферометрии без применения меток в режиме реального времени на биосенсоре Octet® НТХ (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в кинетическом буфере HBST (0,01 М ГЭПЭС, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТУ, 0,05% об/об сурфактанта Твин-20, 0,1 мг/мл БСА), встряхивая планшет при скорости 1000 об/мин. Чтобы оценить, могут ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами рекомбинантного белка РСВ-Ф, экспрессируемого с С-терминальной меткой тус-тус-гексагистидин (РСВ-Ф-mmH), сначала проводили захват около 0,36 им РСВ-Ф-mmH на покрытом анти-пента-His антителом биосенсоре Octet (ForteBio Inc, Cat# 18-5079) путем погружения биосенсора на 3 мин в лунки, содержащие 10 мкг/мл раствора рекомбинантного РСВ-Ф-mmH. Биосенсоры с захваченным антигеном затем насыщали первым анти-РСВ-Ф моноклональным антителом (впоследствии названным mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 100-200 мкг/мл раствора mAb-1 на протяжении 10 мин. После этого биосенсоры погружали в лунки, содержащие 100-200 мкг/мл раствора второго анти-РСВ-Ф моноклонального антитела (впоследствии названного mAb-2) на протяжении 5 мин, чтобы проверить связывание mAb-2 с РСВ-Ф-mmH, предварительно связанным с mAb-1. Биосенсоры промывали в кинетическом буфере HBST между всеми этапами эксперимента. Ответ связывания в режиме реаль-

ного времени отслеживали в продолжение эксперимента и записывали максимальную реакцию связывания для всех этапов. Определяли ответ связывания mAb-2 с РСВ-F-mmH, предварительно связанным с mAb-1, и определяли конкурентное/неконкурентное поведение разных анти-PCB-F моноклональных антител.

Результаты

Исследования последовательного связывания, проводимые на Octet® НТХ, демонстрируют, что анти-PCB-F моноклональные антитела не конкурируют друг с другом и способны неконкурентно связываться с РСВ-F-mmH. Как показано в табл. 16, в темно-серых ячейках с черным шрифтом приведены значения ответа связывания при самоконкурировании. Белые ячейки с черным шрифтом соответствуют отсутствию конкурирования между антителами, что позволяет предположить существование другого эпитопа. Связывание первого анти-PCB-F моноклонального антитела (mAb-1) с анти-His-захваченным белком РСВ-F-mmH не препятствует связыванию второго анти-PCB-F моноклонального антитела (mAb-2). Для всех анти-PCB-F моноклональных антител в этом исследовании наблюдаемый сигнал связывания mAb-2 был сопоставим с тем, который наблюдали в отсутствие mAb-1 (без mAb). Кроме того, наблюдаемое связывание mAb-2 для всех анти-PCB-F моноклональных антител было независимым в отношении порядка связывания анти-PCB-F антитела; что позволяет предположить, что все исследуемые анти-PCB-F моноклональные антитела имеют разные эпитопы связывания.

Таблица 16. Перекрестное конкурирование между анти-PCB-F моноклональными антителами

				Связывание mAb-2 с пре-комплексом из захваченного РСВ-F-mmH и mAb-1			
mAb-1	Количество захваченного 10 мкг/мл RSV_F mmh ± Стд. откл. (нм)	Уровень связывания для количества 100-200 мкг/мл mAb-1 (нм)	mAb#	1	2	3	4
Антитело сравнения III (AM-22)	0,36 ± 0,01	0,33 ± 0,01	1	0,01	0,34	0,44	0,00
Н1Н3592Р3	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	2	0,26	0,00	0,30	0,00
Антитело сравнения I (Паливизумаб)	0,39 ± 0,01	0,45 ± 0,02	3	0,29	0,23	0,01	-0,01
Без mAb	0,36 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	4	0,20	0,17	0,36	0,00

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком F респираторного синцитиального вируса (PCB-F), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарности области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), которые находятся в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 274; и три определяющих комплементарности области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые находятся в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 282.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотной последовательностью PCB-F, содержащей аминокислотные остатки в диапазоне от положения 161 до положения 188 SEQ ID NO: 354.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с PCB-F с K_d в диапазоне от $1,0 \times 10^{-7}$

до $6,0 \times 10^{-10}$ М, определенную методом поверхностного плазмонного резонанса.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающий вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или несколькими остатками в SEQ ID NO: 355 и SEQ ID NO: 356 PCB-F.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.2-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается либо с серином в положении 173 SEQ ID NO: 354, либо с треонином в положении 174 SEQ ID NO: 354, либо как с серином в положении 173 SEQ ID NO: 354, так и с треонином в положении 174 SEQ ID NO: 354.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7.

9. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.

10. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.9.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель, для использования в предотвращении или лечении инфекции РСВ.

12. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 в производстве лекарственного препарата для предотвращения инфекции РСВ у нуждающегося в этом пациента или для лечения пациента, страдающего инфекцией РСВ, или улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с указанной инфекцией.

13. Применение по п.12, где нуждающийся в этом пациент представляет собой пациента с высоким риском развития инфекции РСВ или пациента, у которого может развиться более тяжелая форма инфекции РСВ.

14. Применение по п.12, где нуждающимся в этом пациентом является недоношенный ребенок или доношенный ребенок в возрасте до одного года, ребенок в возрасте одного года или старше или пожилой человек возрастом более 65 лет.

15. Применение по п.13 или 14, где пациент имеет патологическое состояние, выбранное из врожденного порока сердца, хронического заболевания легких, муковисцидоза, иммунодефицита, нервно-мышечного заболевания, застойной сердечной недостаточности или хронического обструктивного заболевания легких.

16. Применение по п.14, где пациент имеет патологию дыхательной, сердечно-сосудистой, нервно-мышечной или иммунной системы.

17. Применение по п.16, где состояние выбрано из патологии дыхательных путей, хронического заболевания легких, хронического заболевания сердца, которое приводит к нарушению управления секретацией из органов дыхания и иммуносупрессии.

18. Применение по п.17, где хроническим заболеванием легких является хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), муковисцидоз или бронхопульмональная дисплазия.

19. Применение по п.17, где хроническим заболеванием сердца является застойная сердечная недостаточность (ЗСН) или врожденный порок сердца.

20. Применение по п.17, где иммуносупрессия, является результатом тяжелого комбинированного иммунодефицита или тяжелого приобретенного иммунодефицита или результатом инфекционного заболевания или ракового состояния, которое приводит к иммуносупрессии, или является результатом лечения иммуносупрессорными лекарственными препаратами или лучевой терапией.

21. Применение по п.12, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из высокой температуры, заложенности носа, кашля, снижения аппетита, гипоксии, затруднения дыхания (учащенного дыхания или нехватки дыхания), свистящего дыхания, апноэ, обезвоживания и изменения психического состояния.

22. Способ предотвращения или лечения инфекции РСВ или по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией РСВ, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 нуждающемуся в этом пациенту.

23. Способ по п.22, в котором инфекция РСВ вызвана респираторным синцитиальным вирусом подтипа А или подтипа В.

24. Способ по п.22, в котором нуждающийся в этом пациент представляет собой пациента с высоким риском развития инфекции РСВ или пациента, у которого может развиться более тяжелая форма инфекции РСВ.

25. Способ по п.24, в котором нуждающимся в этом пациентом является недоношенный ребенок или доношенный ребенок в возрасте до одного года, ребенок в возрасте одного года или старше или пожилой человек возрастом более 65 лет.

26. Способ по п.25, где нуждающийся в этом пациент имеет патологическое состояние, выбранное из врожденного порока сердца, хронического заболевания легких, муковисцидоза, иммунодефицита,

нервно-мышечного заболевания, застойной сердечной недостаточности или хронического обструктивного заболевания легких.

27. Способ по п.24 или 25, в котором пациент страдает от патологии дыхательной, сердечно-сосудистой, нервно-мышечной или иммунной системы.

28. Способ по п.27, в котором состояние выбрано из патологии дыхательных путей, хронического заболевания легких, хронического заболевания сердца, которое приводит к нарушению управления секрецией из органов дыхания и иммуносупрессии.

29. Способ по п.28, в котором хроническим заболеванием легких является хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), муковисцидоз или бронхопульмональная дисплазия.

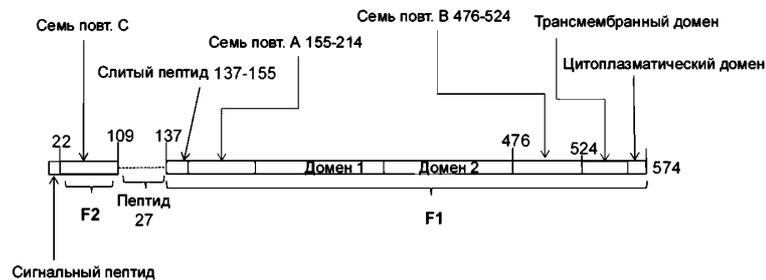
30. Способ по п.28, в котором хроническим заболеванием сердца является застойная сердечная недостаточность (ЗСН) или врожденный порок сердца.

31. Способ по п.28, в котором иммуносупрессия является результатом тяжелого комбинированного иммунодефицита или тяжелого приобретенного иммунодефицита или является результатом любого другого инфекционного заболевания или ракового состояния, которое приводит к иммуносупрессии, или является результатом лечения иммуносупрессорными лекарственными препаратами или лучевой терапии.

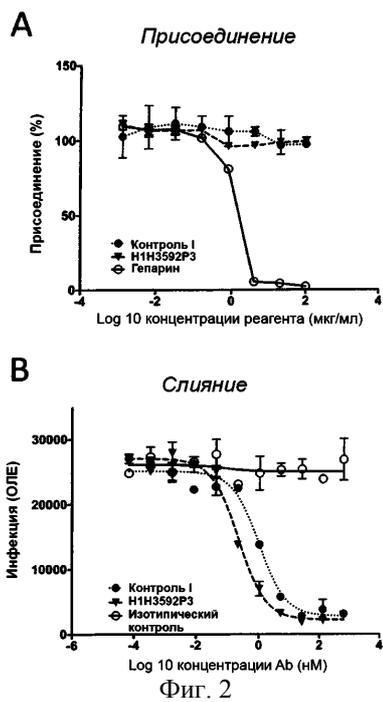
32. Способ по п.22, в котором по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из высокой температуры, заложенности носа, кашля, снижения аппетита, гипоксии, затруднения дыхания, свистящего дыхания, апноэ, обезвоживания и изменения психического состояния.

33. Способ по п.32, в котором затруднение дыхания включает учащенное дыхание или нехватку дыхания.

34. Способ по п.22, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из противовирусного агента; вакцины, специфической в отношении РСВ, вакцины, специфической в отношении вируса гриппа, или вакцины, специфической в отношении метапневмовируса (МПВ); мРНК, специфической в отношении антигена РСВ или антигена метапневмовируса (МПВ); второго антитела, специфического в отношении антигена РСВ или антигена метапневмовируса (МПВ); анти-IL4R антитела, антитела, специфического в отношении антигена вируса гриппа, анти-РСВ-G антитела или НПВП.



Фиг. 1



Фиг. 2

