



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.06

(21) Номер заявки
201690992

(22) Дата подачи заявки
2014.11.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К FcRn

(31) 1320066.2

(32) 2013.11.13

(33) GB

(43) 2016.10.31

(86) PCT/EP2014/074409

(87) WO 2015/071330 2015.05.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Этерфорд Пол Алан, Ческа Томас
Аллен, Финни Хелен Маргарет,
Кеворкян Лара, Саркар Каушик,
Смит Брайан Джон, Тайсон Керри
Луиза (GB)**

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

(56) US-A1-2007092507
WO-A2-2005013912
WO-A2-2009080764
KR-A-20130071961

CHRISTIANSO N GREGORY J. ET AL.:
"Monoclonal antibodies directed against human FcRn
and their applications", MABS, vol. 4, no. 2, March
2012 (2012-03), pages 208-216, XP002700027, ISSN:
1942-0862 the whole document

GETMAN KATE E. ET AL.:
"Pharmacokinetic effects of 4C9, an anti-
FcRn antibody, in rats: implications for the
use of FcRn inhibitors for the treatment
of humoral autoimmune and alloimmune
conditions", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL

SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL
ASSOCIATION, WASHINGTON, US, vol. 94, no.
4, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 718-729,
XP002417287, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/
JPS.20297 the whole document

WARK K. L. ET AL.: "Latest technologies for
the enhancement of antibody affinity", ADVANCED
DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV,
AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006
(2006-08-07), pages 657-670, XP024892147, ISSN:
0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2006.01.025
[retrieved on 2006-08-07] the whole document

WO-A1-2006106323

E. P. ALTSHULER ET AL.: "Generation of
recombinant antibodies and means for increasing
their affinity", BIOCHEMISTRY (MOSCOW), vol.
75, no. 13, 1 December 2010 (2010-12-01), pages
1584-1605, XP055069538, ISSN: 0006-2979, DOI:
10.1134/S0006297910130067 the whole document

CHOWDHURY P. S. ET AL.:
"IMPROVING ANTIBODY AFFINITY BY
MIMICKING SOMATIC HYPERMUTATION IN
VITRO", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE
PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US,
vol. 17, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 568-572,
XP000918985, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/9872
the whole document

ALINA SESARMAN ET AL.: "The neonatal
Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated
autoimmune diseases", CMLS CELLULAR AND
MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHÄUSER-
VERLAG, BA, vol. 67, no. 15, 9 March 2010
(2010-03-09), pages 2533-2550, XP019837829,
ISSN: 1420-9071 the whole document in particular,
pages 2542-2543

WO-A1-2014019727

(57) Изобретение относится к антителу к FcRn или его связывающему FcRn фрагменту, выделенной молекуле ДНК, клонирующему или экспрессирующему вектору, клетке-хозяину для получения антитела или его связывающего фрагмента, способу получения антитела или его связывающего фрагмента, фармацевтической композиции, применению антитела или его связывающего FcRn фрагмента, способу лечения аутоиммунного заболевания у пациента.

Изобретение относится к антителам, специфичным к FcRn, к содержащим их композициям, к их применению в терапии, к способам экспрессии и необязательно к включению в состав указанного антигена, к ДНК, кодирующей антитела, и к хозяевам, содержащим указанную ДНК.

FcRn представляет собой нековалентный комплекс α -цепи мембранного белка FcRn и β 2-микроглобулина (β 2M). У взрослых млекопитающих FcRn играет ключевую роль в поддержании уровня антител в сыворотке путем функционирования в качестве рецептора, который связывает и утилизирует антитела IgG-изотипа. IgG-молекулы подвергаются эндоцитозу эндотелиальными клетками и, если они связываются с FcRn, то они повторно подвергаются обратному трансцитозу, например, в кровотоке. Напротив, IgG-молекулы, которые не связываются с FcRn, проникают в клетки и направляются по лизосомному пути деградации. Вариант IgG1, в котором His435 подвергнут мутации с получением аланина, приводит к селективной потере связывания FcRn и к существенно уменьшенному периоду полужизни в сыворотке (Firan et al. 2001, *International Immunology* 13:993).

Предполагается, что FcRn представляет собой потенциальную мишень для некоторых аутоиммунных расстройств, вызванных по меньшей мере частично аутоантителами. Используемое в настоящее время лечение для некоторых таких расстройств включает плазмаферез. Иногда плазмаферез применяют наряду с иммуноподавляющей терапией при долгосрочной тактике лечения заболевания. Замещение плазмы предлагает самый быстрый краткосрочный ответ для удаления вредных аутоантител. Однако может быть целесообразным подавить продуцирование аутоантител иммунной системой, например, путем использования лекарственных средств, таких как преднизон, циклофосфамид, циклоспорин, микофенолат мофетил, ритуксимаб или их смеси.

Примеры заболеваний, которые могут подвергаться лечению с помощью плазмафереза, включают синдром Гийена-Барре; хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию; синдром Гудпасчера; синдромы гипервязкости; криоглобулинемию; парапротеинемию; макроглобулинемию Вальденстрема; миастению; тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП)/гемолитико-уремический синдром; гранулематоз Вегенера; синдром Ламберта-Итона; антифосфолипидный синдром (APS или APLS); микроскопический полиангиит; рецидивирующий очаговый и сегментарный гломерулосклероз в трансплантированной почке; синдром HELLP; синдром PANDAS; болезнь Рефсума; синдром Бехчета; связанную с ВИЧ невропатию; базедову болезнь у младенцев и новорожденных; пузырчатку обыкновенную; рассеянный склероз, рабдомиолиз и аллоиммунные заболевания.

Плазмаферез иногда используется в качестве резервной терапии для удаления Fc-содержащих лекарственных средств, например в случаях крайней необходимости для уменьшения серьезных побочных эффектов.

Хотя плазмаферез пригоден при некоторых медицинских состояниях, имеются потенциальный риск и затруднения, связанные с данной терапией. Вставка довольно крупного внутривенного катетера может приводить к кровотечению, повреждению легкого (в зависимости от места вставки катетера), и, если катетер остается слишком надолго, то это может приводить к инфекции и/или к поражению вен с ограниченной возможностью повторения процедуры.

Процедура имеет дополнительные затруднения, ассоциированные с этим, например, когда кровь пациента вытекает из тела, попадая в прибор для плазмафереза, кровь при этом имеет тенденцию сворачиваться. Для снижения данной тенденции в одном общепринятом протоколе проводят инфузию цитрата, пока кровь протекает через цепь. Цитрат связывается с кальцием в крови, который является существенным для свертывания крови. Цитрат очень эффективен для предотвращения свертывания крови; однако его использование может приводить к угрожающему для жизни низкому уровню кальция. Это детектируют с помощью симптома Хвостека или симптома Труссо. Для предотвращения данного затруднения кальций инфузируют внутривенно, пока пациент подвергается плазмаферезу; кроме того, также осуществляют добавку кальция через рот.

Другие сложности процедуры включают: гипотензию; потенциальное экспонирование с продуктами крови с риском трансфузионных реакций или заболеваний, передаваемых трансфузией, подавления иммунной системы пациента и кровотечения или гематомы в месте вставки иглы.

Дополнительные средства, которые обеспечивают плазмаферез, ограничены, и процедура является очень дорогой.

Альтернативой плазмаферезу является внутривенное введение иммуноглобулина (IVIg), который представляет собой продукт крови, содержащий объединенные поликлональные IgG, экстрагированные из плазмы более тысячи доноров. Терапию осуществляют внутривенно, и ее продолжительность составляет в районе от 2 недель до 3 месяцев.

Осложнения IVIg-лечения включают головную боль, дерматит, вирусную инфекцию, вызванную контаминацией лекарственного продукта, например, ВИЧ или гепатит, отек легкого, аллергические реакции, острую почечную недостаточность, венозный тромбоз и асептический менингит.

Таким образом, имеется значительная неудовлетворенная потребность в терапии аутоиммунных расстройств, которая менее инвазивна и которая воздействует на пациентов с меньшими медицинскими осложнениями.

Таким образом, имеется значительная неудовлетворенная потребность в терапии иммунологиче-

ских расстройств и/или аутоиммунных расстройств, которая менее инвазивна и которая воздействует на пациентов с меньшими медицинскими осложнениями.

Соответственно, агенты, которые блокируют или снижают связывание IgG с FcRn, могут пригодиться при лечении или предотвращении таких аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Антитела к FcRn были описаны ранее в WO 2009/131702, WO 2007/087289 и WO 2006/118772.

Однако все равно остается потребность в получении улучшенных антител к FcRn.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение касается антитела к FcRn или его связывающего FcRn фрагмента, содержащие тяжелую цепь или фрагмент тяжелой цепи, имеющий вариабельную область, где указанная вариабельная область содержит три CDR, где CDR H1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, CDR H2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и CDR H3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и содержащие легкую цепь или ее фрагмент, имеющий вариабельную область, где указанная вариабельная область содержит три CDR, где CDR L1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, CDR L2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7 и CDR L3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

Вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что антитело является гуманизированным.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело или его связывающий FcRn фрагмент, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, и где вариабельный домен легкой цепи имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16.

Другим вариантом настоящего изобретения является связывающий FcRn фрагмент, отличающийся тем, что связывающий FcRn фрагмент представляют собой scFv-, Fv-, Fab- или Fab'-фрагмент.

Другим вариантом настоящего изобретения является Fab'-фрагмент антитела к FcRn, содержащий тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

Другим вариантом настоящего изобретения является Fab'-фрагмент антитела к FcRn, содержащий тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

Другим вариантом настоящего изобретения является Fab'-фрагмент антитела к FcRn, содержащий тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, отличающиеся тем, что антитело или его связывающий фрагмент конъюгированы с полимером.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, где полимер выбран из крахмала, альбумина и полиэтиленгликоля.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, отличающиеся тем, что полимер представляет собой ПЭГ.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, где ПЭГ имеет молекулярную массу в диапазоне 5-50 кДа.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn, отличающееся тем, что оно представляет собой полноразмерное антитело.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело, отличающееся тем, что полноразмерное антитело выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG4 и IgG4P.

Другим вариантом настоящего изобретения является Антитело к FcRn, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 73, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, отличающиеся тем, что антитело или его связывающий фрагмент представляет собой FcRn-Fv, содержащий тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, которые блокируют связывание человеческого IgG с человеческим FcRn.

Другим вариантом настоящего изобретения является антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, которые не связываются с человеческим β 2-микроглобулином (SEQ ID NO: 72).

Настоящее изобретение касается выделенной молекуле ДНК, кодирующая:

- (a) тяжелую цепь вышеуказанного антитела к FcRn или его связывающий FcRn;
- (b) легкую цепь вышеуказанного антитела к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент; или
- (c) тяжелую и легкую цепь вышеуказанного антитела к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент.

Настоящее изобретение касается клонирующего или экспрессирующего вектора, содержащего вышеуказанную одну или несколько молекул ДНК.

Вариантом настоящего изобретения является вектор, отличающийся тем, что он содержит (i) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 32, 34 или 36, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 или 24, или (ii) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или (iii) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или (iv) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

Настоящее изобретение касается клетке-хозяину для получения вышеуказанного антитела или его связывающего фрагмента, где клетка-хозяин содержит вышеуказанный один или несколько клонирующих или экспрессирующих векторов.

Настоящее изобретение касается способа получения антитела или его связывающего фрагмента, обладающих специфичностью связывания к человеческому FcRn, включающий культивирование вышеуказанной клетки-хозяина и выделение антитела.

Настоящее изобретение касается фармацевтической композиции для лечения аутоиммунного заболевания, содержащая вышеуказанное антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или носителями.

Настоящее изобретение касается применения вышеуказанного антитела или его связывающего FcRn фрагмента в терапии аутоиммунного заболевания.

Вариантом настоящего изобретения является применение вышеуказанной композиции в терапии аутоиммунного заболевания.

Вариантом настоящего изобретения является применение, где аутоиммунное заболевание выбрано из миастении, пузырчатки обыкновенной, оптиконевромиелита, синдрома Гийена-Барре, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

Настоящее изобретение касается способа лечения аутоиммунного заболевания у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества вышеуказанного антитела к FcRn или его связывающего FcRn фрагмента или вышеуказанной композиции.

Вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание выбрано из миастении, пузырчатки обыкновенной, оптиконевромиелита, синдрома Гийена-Барре, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

Таким образом, в одном аспекте предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь или фрагмент тяжелой цепи, содержащий переменную область, где указанная переменная область содержит одну, две или три CDR, независимо выбранных из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, например, где CDR H1 представляет собой SEQ ID NO: 1, CDR H2 представляет собой SEQ ID NO: 2 и/или CDR H3 представляет собой SEQ ID NO: 3.

Таким образом, одно воплощение CDR H1 представляет собой SEQ ID NO: 1, и CDR H2 представляет собой SEQ ID NO: 2, или CDR H1 представляет собой SEQ ID NO: 1, и CDR H3 представляет собой SEQ ID NO: 3, или CDR H2 представляет собой SEQ ID NO: 2, и CDR H3 представляет собой SEQ ID NO: 3.

В другом аспекте предлагается антитело или фрагмент, содержащие последовательность или комбинации последовательностей, как определено в данном документе, например, переменную область родственной пары.

Антитела по изобретению блокируют связывание IgG с FcRn, и, как полагают, они подходят для снижения одной или нескольких биологических функций FcRn, включающих снижение периода полужизни антител в кровотоке. Это может быть полезно, так как дает возможность пациенту быстрее вывести антитела, такие как аутоантитела. Соответственно, антитела по изобретению уменьшают связывание IgG с FcRn.

Важно, что антитела по настоящему изобретению способны связываться с человеческим FcRn, например, при обоих pH 6 и 7,4 со сравнимой и высокой аффинностью связывания. Таким образом, предпочтительно, что антитела способны продолжать связываться с FcRn даже внутри эндосомы, максимизируя посредством этого блокировку связывания FcRn с IgG.

В одном воплощении, антитела или связывающие фрагменты по настоящему изобретению содер-

жат легкую цепь или фрагмент легкой цепи, содержащий вариабельную область, например, содержащий одну, две или три CDR, независимо выбранных из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 6, конкретно где CDR L1 представляет собой SEQ ID NO: 4, CDR L2 представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, и CDR L3 представляет собой SEQ ID NO: 6.

Таким образом, одно воплощение CDR L1 представляет собой SEQ ID NO: 4, и CDR L2 представляет собой SEQ ID NO: 5, или CDR L3 представляет собой SEQ ID NO: 6, или CDR L2 представляет собой SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 7, и CDR L3 представляет собой SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении, антитела или связывающие фрагменты по настоящему изобретению содержат последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1-7, например, где CDR H1 представляет собой SEQ ID NO: 1, CDR H2 представляет собой SEQ ID NO: 2, CDR H3 представляет собой SEQ ID NO: 3, CDR L1 представляет собой SEQ ID NO: 4, CDR L2 представляет собой SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7 и CDR L3 представляет собой SEQ ID NO: 6.

Также предлагается антитело или связывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом, что и антитело или связывающий фрагмент, которые в явной форме раскрыты в данном документе. Ответственно, предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит одну, две, три или четыре аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из остатков E115, W131, P132 и E133 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48), и где антитело к FcRn или его связывающий фрагмент дополнительно связывается с одним или с несколькими (как например со всеми) остатками, выбранными из группы, состоящей из A81, G83, G84, K85, G86, P87, N113, L135, A136 и Q139 и необязательно дополнительно связывается с одним или несколькими остатками, выбранными из группы, состоящей из L82, Y88, L112 и D130.

В одном воплощении, предлагается антитело или связывающий фрагмент, которые перекрестно блокируют связывание антитела или связывающего фрагмента, которые в явной форме раскрыты в данном документе, с человеческим FcRn, или которые перекрестно блокируются от связывания с человеческим FcRn указанным антителом.

В одном воплощении антитела и связывающие фрагменты по настоящему изобретению блокируют связывание человеческого IgG с человеческим FcRn.

В одном воплощении антитела и связывающие фрагменты по настоящему изобретению не связываются с β 2-микроглобулином.

В одном воплощении антитела и связывающие фрагменты по настоящему изобретению не связываются с человеческим β 2-микроглобулином.

В одном примере антитела и связывающие фрагменты по настоящему изобретению не уменьшают уровень альбумина в кровотоке более чем на 50%, предпочтительно не более чем на 25%.

В одном примере антитела и связывающие фрагменты по настоящему изобретению не уменьшают уровень альбумина в кровотоке.

Изобретение также охватывает полинуклеотид, такой как ДНК, кодирующую антитело или фрагмент, описанные в данном документе, например, где ДНК включена в вектор.

Также предлагается клетка-хозяин, содержащая указанный полинуклеотид.

В данном документе предлагаются методы экспрессии антитела или фрагмента, а также методы конъюгации антитела или фрагмента с полимером, таким как ПЭГ.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела и фрагменты.

В одном воплощении предлагается способ лечения, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, фрагмента или композиции, как описано в данном документе.

Настоящее изобретение также охватывает антитело, фрагмент или композицию согласно настоящему изобретению для применения при лечении, конкретно, при лечении иммунологического и/или аутоиммунного расстройства.

Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются антитела, их фрагменты и способы удаления патогенных IgG, чего достигают путем ускорения естественного для организма механизма катаболизма IgG.

По существу, антитела и фрагменты согласно изобретению блокируют систему, которая осуществляет рециклинг IgG в организме.

Настоящая терапия, вероятно, обеспечивает замену или дополнение для лечения некоторых заболеваний, где в качестве терапии используют плазмаферез или IVIg, что является предпочтительным для пациентов.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 демонстрирует % hIgG в трансгенных мышцах, определенный с помощью ЖХ-МС/МС.

Фиг. 1a демонстрирует эффект формата 1638 IgG4P в отношении концентрации человеческого IVIg в сыворотке трансгенной мыши, содержащей человеческий FcRn.

Фиг. 1b демонстрирует эффект форматов 1638 FabFv и Fab'ПЭГ в отношении концентрации человеческого IVIg в трансгенных мышцах, содержащих человеческий FcRn.

Фиг. 1c демонстрирует фармакокинетику формата 1638 IgG4P в сыворотке трансгенных мышей, со-

державших человеческий FcRn.

Фиг. 1d демонстрирует фармакокинетику форматов 1638 FabFv и Fab'ПЭГ в трансгенных мышцах, содержащих человеческий FcRn.

Фиг. 1e - эффект форматов 1638 FabFv и Fab'ПЭГ в отношении концентрации сывороточного альбумина в трансгенных мышцах, содержащих человеческий FcRn.

Фиг. 1f - эффект формата 1638 IgG4P в отношении концентрации сывороточного альбумина в трансгенных мышцах, содержащих человеческий FcRn

Фиг. 2 - демонстрирует репрезентативные кривые связывания CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения K_D (n=3) составили 0,2 нМ в нейтральном буфере, и 0,22 нМ в кислом буфере, соответственно.

Фиг. 3 - демонстрирует, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует рециклинг IgG в клоне 15 клеток MDCK II.

Фиг. 4 - демонстрирует, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует транцитоз IgG в клоне 15 клеток MDCK II

Фиг. 5 - демонстрирует, что CA170_1638.g49 FabFv ингибирует транцитоз IgG в клоне 15 клеток MDCK II.

Фиг. 6 - демонстрирует репрезентативные кривые связывания для CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения KD (n=3) составили 0,3 в нейтральном буфере и 0,43 в кислом буфере, соответственно. (см. табл. 2).

Фиг. 7 - демонстрирует последовательности CA170_1638 CDR.

Фиг. 8 - последовательности антител согласно настоящему описанию изобретения.

Фиг. 9a - гуманизация антитела 1638.g49.

Фиг. 9b - гуманизация антитела 1638.g49.

Подробное описание изобретения FcRn, применяемый в настоящем документе, относится к нековалентному комплексу между альфа-цепью рецептора человеческого IgG, также известного как неонатальный Fc-рецептор, аминокислотная последовательность которого представлена в UniProt под номером P55899, внеклеточный домен которого представлен на фиг. 8 (SEQ ID NO: 48), вместе с человеческим β 2-микроглобулином (β 2M), аминокислотная последовательность которого представлена в UniProt под номером P61769 (представленный в данном документе с сигнальным пептидом (SEQ ID NO: 50), без сигнального пептида (SEQ ID NO: 72)).

Молекула антитела, применяемая в данном документе, относится к антителу или к его связывающему фрагменту.

Термин "антитело", используемый в данном документе, как правило, относится к интактным (цельным) антителам, т.е. содержащим элементы двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Антитело может содержать дополнительные домены связывания, например, как для молекулы DVD-Ig, раскрытой в WO 2007/024715, или как так называемый (FabFv)₂Fc, описанный в WO 2011/030107. Таким образом, антитело, применяемое в данном документе, включает би-, три- или тетравалентные антитела.

Связывающие фрагменты антител включают одноцепочечные антитела (т.е. полноразмерную тяжелую цепь и легкую цепь); Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, однодоменные антитела (например, VH или VL, или VHH), scFv, dsccFv, би-, три- или тетравалентные антитела, Бис-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Методы создания и получения таких фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Формат Fab-Fv был впервые раскрыт в WO 2009/040562, а его варианты, стабилизированные дисульфидами, Fab-dsFv, были впервые раскрыты в WO 2010/035012. Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в Международных патентных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Поливалентные антитела могут содержать множество специфичностей, например, могут быть биспецифичными или моноспецифичными (см., например, WO 092/22583 и WO 05/113605). Один такой пример последних представляет собой Tri-Fab (или TFM), как описано в WO 92/22583.

В одном воплощении предлагается Fab-фрагмент.

В одном воплощении предлагается Fab'-фрагмент.

Типичная молекула Fab' содержит пару тяжелой и легкой цепи, где тяжелая цепь содержит переменную область Vh, константный домен ChI и натуральную или модифицированную шарнирную область, и легкая цепь содержит переменную область Vl и константный домен Cl.

В одном воплощении согласно настоящему изобретению предлагается димер Fab' с получением F(ab')₂, где димеризация может осуществляться, например, через шарнир.

В одном воплощении, антитело или его связывающий фрагмент содержит домен связывания. Домен связывания будет, как правило, содержать 6 CDR, три из тяжелой цепи и три из легкой цепи. В одном воплощении, CDR находится в каркасе и вместе образуют переменную область. Таким образом, в одном воплощении, антитело или связывающий фрагмент содержит домен связывания, специфичный для антигена, содержащий переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи.

Будет понятно, что может быть осуществлена одна или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, вставок и/или делеций в CDR или в других последовательностях (например, в переменных доменах), представленных настоящим изобретением, без значительного изменения способности антитела связываться с FcRn. Эффект любой из аминокислотных замен, вставок и/или делеций может быть легко протестирован специалистом в данной области, например, путем использования методов, описанных в данном документе, конкретно в примерах, для определения связывания/блокировки FcRn.

Могут быть осуществлены одна или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области, применяемой в антителе или в его фрагменте, представленном настоящим изобретением, где аффинность связывания с FcRn сохраняется или увеличивается.

Остатки в переменных доменах антитела пронумерованы стандартным образом согласно системе, разработанной Kabat et al. Данная система представлена в Kabat et al, 1987, в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Kabat et al. (выше)"). Данная система нумерации используется в настоящем описании за исключением случаев, где указано иное.

Обозначения остатков по Kabat не всегда соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, в отличие от строгой нумерации по Kabat, соответствующая укорачиванию или вставке структурного компонента, будь то каркасная область или область, определяющая комплементарность (CDR) основной структуры переменного домена. Корректная нумерация остатков по Kabat может определяться для данного антитела путем выравнивания остатков гомологии в последовательности антитела с последовательностью со "стандартной" нумерацией по Kabat.

CDR переменного домена тяжелой цепи локализованы в остатках 31-35 (CDR-H1), остатках 50-65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3) согласно системе нумерации Kabat. Однако согласно Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol, 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, протягивается от остатка 26 к остатку 32. Таким образом, до тех пор, пока не указано иное, обозначение "CDR-H1", применяемое в данном документе, относится к остаткам 26-35, как описано с помощью комбинации системы нумерации по Kabat и определения топологической петли по Chothia.

CDR переменного домена легкой цепи локализованы в остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и в остатках 8 9-97 (CDR-L3) согласно системе нумерации Kabat.

Антитела и фрагменты настоящего описания изобретения блокируют FcRn и посредством этого могут предотвращать его функционирование в рециклинге IgG. Блокировка, применяемая в данном документе, относится к физической блокировке, такой как поглощение рецептора, но также включает случай, где антитело или фрагменты связываются с эпитопом, что обуславливает, например, конформационное изменение, которое означает, что природный лиганд больше не связывается с рецептором. Молекулы антител по настоящему изобретению связываются с FcRn и посредством этого уменьшают или предотвращают (например, ингибируют) связывание FcRn с константной областью IgG. В одном воплощении, антитело или его фрагмент связывается с FcRn конкурентно по отношению к IgG.

В одном примере, антитело или его связывающий фрагмент функционирует в качестве конкурентного ингибитора связывания человеческого FcRn с человеческим IgG. В одном примере, антитело или его связывающий фрагмент связывается с сайтом связывания IgG на FcRn. В одном примере антитело блокирует сайт связывания IgG. В одном примере антитело или его связывающий фрагмент не связывается с $\beta 2M$.

Антитела для применения в настоящем изобретении могут быть получены с использованием любого подходящего метода, известного в данной области. Полипептид/белок FcRn, в том числе химерные белки, клетки, (рекомбинантно или естественно) экспрессирующие полипептид (как например активированные Т-клетки), могут использоваться для продуцирования антител, которые специфично распознают FcRn, индивидуально или в комбинации с $\beta 2M$. Полипептид может представлять собой "зрелый" полипептид или его биологически активный фрагмент или производное. Человеческий белок зарегистрирован в базе данных Swiss-Prot под номером P55899. Внеклеточный домен альфа-цепи человеческого FcRn представлен в SEQ ID NO: 48. Последовательность зрелого человеческого $\beta 2M$ представлена в SEQ ID NO: 72.

В одном воплощении антиген представляет собой мутантную форму FcRn, которая сконструирована для презентирования FcRn на поверхности клетки, так чтобы при интернализации FcRn в клетке динамического процессирования было мало или оно отсутствовало, чего можно достичь, например, путем создания мутации в цитоплазматическом хвосте альфа-цепи FcRn, где ди-лейцин подвергают мутации до ди-аланина, как описано в Ober et al 2001 Int. Immunol. 13, 1551-1559.

Полипептиды для применения при иммунизации хозяина могут быть получены с помощью способа, хорошо известного в данной области, из генетически сконструированных клеток-хозяев, содержащих системы экспрессии, или они могут быть извлечены из естественных биологических источников. В настоящей заявке термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Они используются взаимозаменяемо до тех пор, пока не указано иное. В некоторых случаях полипептид FcRn является частью более крупного белка, такого как химерный белок, например, сшитый с аффинной меткой или с

чем-то подобным.

Могут быть получены антитела, созданные против полипептида FcRn, где иммунизация животного необходима, путем введения полипептидов животному, предпочтительно не человеку, с использованием хорошо известных и стандартных протоколов, см., например, *Handbook of Experimental Immunology*, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Многие теплокровные животные, такие как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи могут быть иммунизированы. Однако наиболее подходящими являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью метода, известного в данной области, такого как гибридомный метод (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), триомный метод, метод гибридомы человеческих В-клеток (Kozbor et al, 1983, *Immunology Today*, 4:72) и метод EBV-гибридомы (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитела для применения в изобретении также могут быть созданы с использованием методов антитела единственного лимфоцита путем клонирования и экспрессии кДНК варибельной области иммуноглобулина, полученного из единственного лимфоцита, выбранного для продуцирования специфических антител, например, с использованием способов, описанных в Babcock, J. et al, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15):7843-78481; WO 92/02551; WO 2004/051268 и в международной патентной заявке WO 2004/106377.

Скрининг антител может осуществляться с использованием анализов для измерения связывания с человеческим FcRn и/или анализов для измерения способности блокировать связывание IgG с рецептором. Примером анализа связывания является ИФА, конкретно, с использованием химерного белка человеческого FcRn и человеческого Fc, который иммобилизуют на планшетах, и с применением вторичного антитела для детектирования антитела к FcRn, связанного с химерным белком. Примеры подходящих антагонистических и блокирующих анализов описаны в данном документе ниже.

Подразумевается, что термин "специфичное", применяемый в данном документе, относится к антителу, которое только распознает антиген, к которому оно специфично, или к антителу, которое обладает значительно более высокой аффинностью связывания с антигеном, к которому оно специфично, по сравнению со связыванием с антигенами, к которым оно не специфично, например, к антителу с аффинностью связывания по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз выше. Аффинность связывания может быть измерена с помощью методов, таких как ВІАсоге, как описано в данном документе ниже. В одном примере антитело по настоящему изобретению не связывается с β 2-микроглобулином (β 2М). В одном примере антитело по настоящему изобретению связывается с FcRn макаки. В одном примере антитело по настоящему изобретению не связывается с крысиным или мышинным FcRn.

Предлагаются аминокислотные последовательности и полинуклеотидные последовательности некоторых антител согласно настоящему изобретению, и они образуют аспект изобретения.

В одном воплощении, антитела или связывающие фрагменты согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими, например, получены из фаговой библиотеки или аналогичным образом.

В одном примере антитела относятся к антителам грызунов, как например, к выделенным из крысы и содержат последовательность варибельного домена легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8, и последовательность варибельного домена тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 12.

В одном воплощении антитело или фрагменты согласно изобретению являются гуманизованными.

Гуманизованные антитела (которые включают CDR-привитые антитела) представляют собой Молекулы антител, содержащие одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR), из видов животных, но не человека, и каркасную область из молекулы человеческого иммуноглобулина (см., например, US 5585089; WO 91/09967). Понятно, что может быть необходимо только перенести остатки, определяющие специфичность CDR, а не всю CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). Гуманизованные антитела необязательно дополнительно могут содержать один или несколько каркасных остатков, выделенных из видов животных, но не из человека, из которых были выделены CDR. Последние часто обозначаются как донорные остатки.

Таким образом, в одном воплощении, используемый в данном документе термин "гуманизованная молекула антитела" относится к молекуле антитела, где тяжелая и/или легкая цепь содержит одну или несколько CDR (включая, если целесообразно, одну или несколько модифицированных CDR) из донорного антитела (например, антитела животного, но не человека, как например, мышинное моноклональное антитело), привитых в каркас варибельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, человеческого антитела), необязательно дополнительно содержащего один или несколько каркасных остатков, выделенных из видов животных, но не из человека, из которых были выделены CDR (донорные остатки). Для обзора см., Vaughan et al, *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. В одном воплощении только один или несколько из остатков, определяющих специфичность, из любой из CDR, описанных в данном документе выше, переносят в каркас человеческого антитела, а не всю CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). В одном воплощении только остатки, определяющие специфичность, из одной или из нескольких CDR, описанных в данном документе выше, пере-

носят на каркас человеческого антитела. В другом воплощении только остатки, определяющие специфичность, из каждой из CDR, описанные в данном документе выше, переносят на каркас человеческого антитела.

Когда прививают CDR или остатки, определяющие специфичность, то может использоваться любая подходящая каркасная последовательность акцепторной варибельной области, имеющая отношение к классу/типу донорного антитела, из которого выделены CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека.

Соответственно, гуманизованное антитело согласно настоящему изобретению содержит варибельный домен, содержащий человеческие акцепторные каркасные области, а также одну или несколько CDR, конкретно представленных в данном документе. Таким образом, в одном воплощении предлагается блокирующее гуманизованное антитело, которое связывается с человеческим FcRn, где варибельный домен содержит человеческие акцепторные каркасные области и донорные CDR из животных, но не из человека.

Примеры человеческих каркасов, которые могут использоваться в настоящем изобретении, представляют собой KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEL, LAY и POM (Kabat et al, supra). Например, KOL и NEWM могут использоваться для тяжелой цепи, REI может использоваться для легкой цепи, и EU, LAY и POM могут использоваться как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно, могут использоваться человеческие зародышевые последовательности; они доступны по адресу <http://www.imgt.org/>.

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению акцепторные тяжелая и легкая цепи обязательно нуждаются в доставке из того же антитела и могут, если целесообразно, содержать составные цепи, содержащие каркасные области, выделенные из различных цепей.

Одну такую подходящую каркасную область для тяжелой цепи гуманизованного антитела по настоящему изобретению выделяют из человеческой последовательностиIGHV3-7 подгруппы VH3 вместе с JH3 (SEQ ID NO: 46 и 47).

Соответственно, в одном примере предлагается гуманизованное антитело, содержащее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, для CDR-H1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, для CDR-H2 и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, для CDRH3, где каркасная область тяжелой цепи выделена из человеческой последовательностиIGHV3-7 подгруппы VH3 вместе с JH3.

Последовательность человеческого JH3 представлена ниже: (DAFDV)WGQGTMTVTS (SEQ ID NO: 69). Мотив DAFDV (SEQ ID NO: 70) является частью CDR-H3 и не является частью каркаса 4 (Ravetch, JV. et al, 1981, Cell, 27, 583-591).

В одном примере варибельный домен тяжелой цепи антитела содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25 или 59, как например 25.

Подходящую каркасную область для легкой цепи гуманизованного антитела по настоящему изобретению выделяют из человеческой последовательностиIGKV1-27 подгруппы VK1 вместе с JK4 (SEQ ID NO: 44 и 45).

Соответственно, в одном примере предлагается гуманизованное антитело, содержащее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, для CDR-L1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, для CDR-L2 и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, для CDRL3, где каркасная область легкой цепи выделена из человеческой последовательностиIGKV1-27 подгруппы VK1 вместе с JK4.

Последовательность JK4 представлена ниже: (LT)FGGGTKVEIK (Seq ID NO: 71). Мотив LT является частью CDR-L3 и не является частью каркаса 4 (Hieter, PA., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

В одном примере варибельный домен легкой цепи антитела содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 или 51, как например 16.

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению каркасные области не нуждаются в точно такой же последовательности, как у акцепторного антитела. Например, нетипичные остатки могут быть заменены на более часто встречающиеся остатки для класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях могут быть заменены так, что они будут соответствовать остатку, присутствующему в таком же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие замены следует поддерживать на минимальном необходимом уровне для получения аффинности донорного антитела. Протокол для выбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые могут нуждаться в замене, представлен в WO 91/09967.

Таким образом, в одном воплощении, 1, 2, 3, 4 или 5 остатков в каркасе заменяют на альтернативные аминокислотные остатки.

Соответственно, в одном примере предлагается гуманизованное антитело, где по меньшей мере остатки в каждом из положений 48 и 78 варибельного домена тяжелой цепи (нумерация Kabat) являются донорными остатками, см., например, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В одном воплощении остаток 48 варибельного домена тяжелой цепи заменяют на альтернативную

аминокислоту, например, на валин.

В одном воплощении остаток 78 переменного домена тяжелой цепи заменяют на альтернативную аминокислоту, например, лейцин.

В одном воплощении, остаток 48 представляет собой валин, а остаток 78 представляет собой лейцин в переменной области гуманизированной тяжелой цепи согласно настоящему изобретению.

Соответственно, в одном примере предлагается гуманизированное антитело, где по меньшей мере остатки в каждом из положений 70 и 71 переменного домена легкой цепи (нумерация Kabat) являются донорными остатками, см., например, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

В одном воплощении остаток 70 переменного домена легкой цепи заменяют на альтернативную аминокислоту, например, на аспарагиновую кислоту.

В одном воплощении остаток 71 переменного домена легкой цепи заменяют на альтернативную аминокислоту, например, на фенилаланин.

В одном воплощении, остаток 70 представляет собой аспарагиновую кислоту, а остаток 71 представляет собой фенилаланин в переменной области гуманизированной легкой цепи согласно настоящему изобретению.

В одном воплощении, в изобретении предлагается последовательность антитела, которая является на 80% сходной или идентичной последовательности, раскрытой в данном документе, например на 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% относительно части или целой соответствующей последовательности, например, последовательности переменного домена, последовательности CDR или последовательности переменного домена за исключением CDR. В одном воплощении соответствующая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 16 или 51. В одном воплощении соответствующая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 25 или 59.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается молекула антитела, которая связывается с человеческим FcRn, содержащая тяжелую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности или сходства с последовательностью данного документа, например с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25 или 59, как например 25.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается молекула антитела, которая связывается с человеческим FcRn, содержащая легкую цепь, где переменный домен легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности или сходства с последовательностью данного документа, например с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16 или 51, как например 16.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается молекула антитела, которая связывается с человеческим FcRn, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, который по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходен или идентичен последовательности, представленной в данном документе, например, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, но где молекула антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, для CDR-H1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, для CDR-H2, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, для CDR-H3.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается молекула антитела, которая связывается с человеческим FcRn, где антитело содержит переменный домен легкой цепи, который по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходен или идентичен последовательности, представленной в данном документе, например, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, но где молекула антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, для CDR-L1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или в SEQ ID NO: 7, для CDR-L2, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, для CDR-L3.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается молекула антитела, которая связывается с человеческим FcRn, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, который по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходен или идентичен последовательности, представленной в данном документе, например, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, и переменный домен легкой цепи, который по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходен или идентичен последовательности, представленной в данном документе, например, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, но где молекула антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, для CDR-H1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, для CDR-H2, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, для CDR-H3, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, для CDR-L1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, для CDR-L2, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, для CDR-L3.

Используемый в данном документе термин "идентичность" выявляет, что в любом конкретном положении в сравниваемых последовательностях аминокислотные остатки между последовательностями будут идентичны. Используемый в данном документе термин "сходство" выявляет, что в любом конкретном положении в сравниваемых последовательностях аминокислотные остатки между последовательностями будут относиться к сходному типу. Например, лейцин может быть заменен на изолейцин

или валин. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены на другие, включают, но не ограничиваются этим:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи) и
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие сера-содержащие боковые цепи).

Степень идентичности и сходства можно легко рассчитать (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программа BLAST™, доступная из NCBI (Altschul, S.F. et al, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).

Молекулы антител по настоящему изобретению могут содержать цельную молекулу антитела, содержащую полноразмерную тяжелую и легкую цепь или их фрагменты, и может представлять собой в частности Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL, или VHH), scFv, dsccFv, би-, три- или тетравалентные антитела, Бис-scFv, диатела, тритела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Методы создания и получения таких фрагментов антитела хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в Международных патентных заявках WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Поливалентные антитела могут содержать множество специфичностей, например, могут быть биспецифичными или моноспецифичными (см., например, WO92/22583, WO05/113605, WO2009/040562 и WO2010/035012).

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab-фрагмент антитела, содержащий вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 16 и 25, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab-фрагмент антитела, содержащий вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 51 и 59, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab- или Fab'-фрагмент антитела, содержащий вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 16 и 25, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (Fab) или SEQ ID NO: 33 (Fab').

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab'-фрагмент антитела, содержащий вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 51 и 59, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG1, содержащее вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 16 и 25, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG1, содержащее вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 51 и 59.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG4, содержащее вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 16 и 25, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерный формат антитела IgG4, содержащего вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 51 и 59, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела

имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полно-размерное антитело IgG4P, содержащее вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 16 и 25, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39.

В одном воплощении молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полно-размерный формат антитела IgG4P, содержащего вариабельные области, представленные в SEQ ID NO: 51 и 59, например, для легкой и тяжелой цепи, соответственно. В одном воплощении молекула антитела имеет легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, и тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

Применяемый в данном документе IgG4P представляет собой подвергнутый мутации IgG4-изотип дикого типа, где аминокислота 241 заменена пролином, см., например, случай, где серин в положении 241 заменили на пролин, как описано в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108.

В одном воплощении антитело согласно настоящему изобретению предлагается в виде FcRn-связывающего антитела, представляющего химерный белок, который содержит иммуноглобулиновый компонент, например, Fab- или Fab'-фрагмент и одно или два однодоменных антитела (dAb), связанных с ним прямо или косвенно, например, как описано в WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492 и WO2011/086091, которые все включены в данный документ ссылкой.

В одном воплощении химерный белок содержит двудоменные антитела, например, в виде пары вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL), необязательно связанных дисульфидной связью.

В одном воплощении Fab- или Fab'-элемент химерного белка обладает такой же или сходной специфичностью как у однодоменного антитела или антител. В одном воплощении Fab или Fab' обладает отличной специфичностью по отношению к однодоменному антителу или к антителам, то есть химерный белок является поливалентным. В одном воплощении поливалентный химерный белок согласно настоящему изобретению содержит сайт связывания альбумина, например, там пара VH/VL обеспечивает сайт связывания с альбумином. В одном таком воплощении тяжелая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40.

В одном воплощении Fab или Fab' согласно настоящему изобретению конюгирован с молекулой ПЭГ или с человеческим сывороточным альбумином.

CA170_01638g49 и 1638.g49 применяются в данном документе взаимозаменяемо и используются для обозначения специфической пары вариабельных областей антитела, которые могут использоваться в ряде различных форматов. Эти вариабельные области представляют собой последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16.

CA170_01638g28 и 1638.g28 применяются в данном документе взаимозаменяемо и используются для обозначения специфической пары вариабельных областей антитела, которые могут использоваться в ряде различных форматов. Эти вариабельные области представляют собой последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 59, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 51.

Домены константных областей молекулы антитела по настоящему изобретению, если они присутствуют, могут быть выбраны, принимая во внимание предполагаемую функцию молекулы антитела и, конкретно, эффекторную функцию, которая может потребоваться. Например, домены константных областей могут представлять собой домены человеческих IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Конкретно, могут использоваться домены константной области человеческого IgG, особенно изотипов IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначается для терапевтических применений, и требуются эффекторные функции антитела. Альтернативно, изотипы IgG2 и IgG4 могут использоваться, когда молекула антитела предназначается для терапевтических целей, и эффекторные функции антитела не являются необходимыми. Понятно, что также могут использоваться варианты последовательности этих доменов константных областей. Например, могут использоваться молекулы IgG4, в которых серин в положении заменен на пролин, как описано в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Специалисту в данной области понятно, что антитела могут подвергаться множеству посттрансляционных модификаций. Тип и степень этих модификаций часто зависит от линии клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окисление метионина, образование diketопиперазина, изомеризацию аспартата и дезаминирование аспарагина. Частой модификацией является потеря C-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) благодаря действию карбоксипептидаз (как описано в Harris, R.J. *Journal of Chromatograph* у 705:129-134, 1995). Соответственно, C-концевой лизин тяжелой цепи может отсутствовать.

В одном воплощении тяжелая цепь антитела содержит CH1-домен и легкая цепь антитела содержит

CL-домен, либо каппа, либо лямбда.

В одном таком воплощении легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29.

В одном таком воплощении легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном таком воплощении легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

В одном таком воплощении легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74.

В одном воплощении С-концевая аминокислота из молекулы антитела отщепляется во время пост-трансляционных модификаций.

В одном воплощении N-концевая аминокислота из молекулы антитела отщепляется во время пост-трансляционных модификаций.

Также в настоящем изобретении предлагается специфическая область или эпитоп человеческого FcRn, который связывается антителом, предложенным в настоящем изобретении, конкретно, антителом, содержащим последовательность gH33 (SEQ ID NO: 25) тяжелой цепи и/или последовательность gL7 (SEQ ID NO: 16) легкой цепи, или антителом, содержащим последовательность gH2 (SEQ ID NO: 59) тяжелой цепи и последовательность gL2 (SEQ ID NO: 51) легкой цепи.

Данная специфическая область или эпитоп полипептида человеческого FcRn может идентифицироваться с помощью любого подходящего метода картирования эпитопов, известного в данной области, в комбинации с любым из антител, предлагаемых в настоящем изобретении. Примеры таких методов включают скрининг пептидов различной длины, выделенных из FcRn, на предмет связывания с антителом по настоящему изобретению с использованием наименьшего фрагмента, который может специфично связываться с антителом, содержащим последовательность эпитопа, распознаваемую антителом. Пептиды FcRn могут быть получены синтетически или с помощью протеолитического гидролиза полипептида FcRn. Пептиды, которые связываются с антителом, могут быть идентифицированы, например, с помощью анализа масс-спектрометрии. В другом примере, ЯМР-спектроскопия или рентгеноструктурная кристаллография могут использоваться для идентификации эпитопа, связанного антителом по настоящему изобретению. В одном примере, где используется рентгеноструктурная кристаллография, эпитопы определяют в виде таких остатков на полипептиде FcRn, которые располагаются внутри области 4 Å антитела. В одном примере, эпитоп определяют в таких остатках на полипептиде FcRn, которые располагаются внутри области 5 Å антитела. После идентификации эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, может использоваться, если потребуется, в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связываются с таким же эпитопом.

В одном воплощении, антитело по настоящему изобретению связывается с внеклеточной последовательностью альфа-цепи человеческого FcRn, как представлено ниже:

AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFVWSGWLGPQQYLSYNSLRGEAEP CGAWVWENQVSV

YWEKETTDLR I KEKLFLEAFKA **ALGGKGP**YTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFA **LN**GEEFMNF~~DLK~~

QGTWGGD**WPE**ALAI **SQR**WQQDKAANKELTFLLFSCPH

RLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFPPELQLRFLRNLGAAGTGQGD

FGPNSDGSFHASSSLTVKSGDENHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSS (SEQ ID

NO: 48) .

Подчеркнутые остатки это те, которые, как известно, являются критическими при взаимодействии человеческого FcRn с Fc-областью человеческого IgG. Выделенные жирным шрифтом это остатки человеческого FcRn-полипептида, вовлеченные в связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16, т.е. они располагаются внутри области 4Å антитела, как определено с помощью рентгеноструктурной кристаллографии. Остатки, выделенные курсивом, это те, которые вовлечены в связывание такого же антитела в области 5Å.

В одном аспекте изобретения, предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит одну, две, три или четыре аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из остатков E115, W131, P132 и E133 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48), и где антитело к FcRn или его связывающий фрагмент дополнительно связывается с одним или с несколькими остатками, как например, с двумя, тремя, четырьмя, пятью, семью, семью, девятью или с десятью остатками, выбранными из группы, состоящей из A81, G83, G84, K85, G86, P87, N113, L135, A136 и Q139 и необязательно дополнительно связывается с одним или несколькими остатками, выбранными из группы, состоящей из L82, Y88, LI 12 и D130.

Соответственно, в одном примере предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит одну, две, три или четыре аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из остатков E115, W131, P132, и E133, и по меньшей мере

один остаток, например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 остатков, выбранных из группы, состоящей из A81, G83, G84, K85, G86, P87, N113, L135, A136 и Q139, и где указанное антитело к FcRn или его связывающий фрагмент необязательно дополнительно связывается с одним или с несколькими остатками, например, по меньшей мере с 2, 3 или 4 остатками, выбранными из группы, состоящей из L82, Y88, L112 и D130 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере антитело согласно данному аспекту изобретения не связывается с V105, P106, T107, A108 и K109 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере антитело согласно данному аспекту изобретения не связывается с E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124, G128 и G129 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере, антитело согласно данному аспекту изобретения не связывается с V105, P106, T107, A108, K109, E116, F117, M118, N119, F120, D121, L122, K123, Q124, G128, и G129 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит одну, две, три или четыре аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из остатков E115, W131, P132, и E133, и по меньшей мере один остаток, например по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков, выбранных из группы, состоящей из A81, L82, G83, G84, K85, G86, P87 и Y88 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит одну, две, три или четыре аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из остатков E115, W131, P132, и E133, и по меньшей мере один остаток, например по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 остатков, выбранных из группы, состоящей из L112, N113, D130, L135, A136 и Q139 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит одну, две, три или четыре аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из остатков E115, W131, P132, и E133, и по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из A81, L82, G83, G84, K85, G86, P87, Y88, L112, N113, D130, L135, A136, и Q139 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит остатки E115, W131, P132, и E133, и по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из A81, L82, G83, G84, K85, G86, P87, Y88, L112, N113, D130, L135, A136, и Q139 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере в настоящем изобретении предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит или состоит из остатков A81, G83, G84, K85, G86, P87, N113, E115, W131, P132, E133, L135, A136, и Q139 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном примере в настоящем изобретении предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент, который связывается с эпитопом человеческого FcRn, который содержит или состоит из остатков A81, L82, G83, G84, K85, G86, P87, Y88, L112, N113, E115, D130, W131, P132, E133, L135, A136, и Q139 внеклеточного домена человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48).

В одном воплощении настоящего изобретения предлагаются полностью человеческие антитела, которые связываются с эпитопом, описанным в данном документе выше. В одном воплощении они являются гуманизированными. В одном примере, они обладают аффинностью к человеческому FcRn, составляющей 150 пМ или менее, обычно 130 пМ или менее.

Антитела, которые перекрестно блокируют связывание молекулы антитела согласно настоящему изобретению, конкретно, молекулы антитела, содержащей последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16, могут одинаково использоваться при блокировке активности FcRn. Соответственно, в настоящем изобретении также предлагается молекула антитела к FcRn, которая перекрестно блокирует связывание любой из молекул антитела, описанных выше в данном документе, с человеческим FcRn и/или перекрестно блокируется от связывания человеческого FcRn любым из этих антител. В одном воплощении, такое антитело связывается с таким же эпитопом, описанным в данном документе выше. В другом воплощении, перекрестно-блокирующее нейтрализующее антитело связывается с эпитопом, который граничит и/или перекрывается с эпитопом, связанным антителом, описанным выше в данном документе.

Перекрестно-блокирующие антитела могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего метода, известного в данной области, например, с использованием конкурентного ИФА или анализа ВІАсоге, где связывание перекрестно-блокирующего антитела с человеческим FcRn предотвращает связывание антитела по настоящему изобретению или наоборот. Такие анализы перекрестной блокировки могут использовать естественный или рекомбинантный FcRn или подходящий химерный белок/полипептид. В одном примере, связывание и перекрестную блокировку измеряют с использованием внеклеточного домена рекомбинантного человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48). В одном примере, внеклеточный домен альфа-цепи рекомбинантного человеческого FcRn используется в комплексе с β 2-

микроглобулином $\beta 2M$) (SEQ ID NO: 72).

В одном воплощении, предлагается молекула антитела к FcRn, которая блокирует связывание FcRn с IgG и которая перекрестно блокирует связывание антитела, чья тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и чья легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, с человеческим FcRn. В одном воплощении, перекрестно-блокирующие антитела, предлагаемые настоящим изобретением, ингибируют связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16, более чем на 80%, например, более чем на 85%, как например, более чем на 90%, конкретно, более чем на 95% ингибирования.

В одном воплощении перекрестно-блокирующие антитела, предлагаемые настоящим изобретением, являются полностью человеческими. В одном воплощении перекрестно-блокирующие антитела, предлагаемые настоящим изобретением, являются гуманизированными. В одном воплощении перекрестно-блокирующие антитела, предлагаемые настоящим изобретением, имеют аффинность к человеческому FcRn, составляющую 150 пМ или менее, 130 пМ или менее или 100 пМ или менее. В одном воплощении перекрестно-блокирующие антитела, предлагаемые настоящим изобретением, имеют аффинность к человеческому FcRn, составляющую 50 пМ или менее. Аффинность может измеряться с использованием методов, описанных в данном документе ниже.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты содержат кислотные и/или основные функциональные группы, придавая таким образом молекуле суммарный положительный или отрицательный заряд. Количество общего "наблюдаемого" заряда будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности структуры, локального окружения заряженных групп в 3D-структуре и от условий окружающей среды молекулы. Изоэлектрическая точка (p_i) представляет собой pH, при котором конкретная молекула или ее поверхность, доступная растворителю, не несет никакого суммарного электрического заряда. В одном примере, антитело к FcRn и фрагменты по изобретению могут быть сконструированы так, чтобы они имели подходящую изоэлектрическую точку. Это может приводить к получению антител и/или их фрагментов с более сильными свойствами, конкретно, с подходящими профилями растворимости и/или стабильности и/или с улучшенными характеристиками очистки.

Таким образом, в одном аспекте изобретения предлагается гуманизированное антитело к FcRn, сконструированное так, что оно имеет изоэлектрическую точку, отличную от изоэлектрической точки исходного идентифицированного антитела. Антитело может, например, быть сконструировано путем замены аминокислотного остатка, такой как замена аминокислотного остатка на один или несколько основных аминокислотных остатков. Альтернативно, основные аминокислотные остатки могут вводиться или кислотные аминокислотные остатки могут удаляться. Альтернативно, если молекула имеет неприемлемо высокое значение p_i , то при необходимости могут вводиться кислотные остатки для снижения p_i . Важно, что при манипуляции с p_i следует принимать во внимание сохранение целевой активности антитела или его фрагмента. Таким образом, в одном воплощении сконструированное антитело или его фрагмент обладает такой же или, по существу, такой же активностью, как у "немодифицированного" антитела или фрагмента.

Такие программы, как ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, и http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, могут использоваться для предсказания значения изоэлектрической точки антитела или его фрагмента. Альтернативно или дополнительно, p_i может измеряться с использованием любого подходящего стандартного лабораторного метода.

Молекула антитела по настоящему изобретению, соответственно, обладает высокой аффинностью связывания, конкретно, в наномолярном диапазоне. Аффинность может измеряться с использованием любого подходящего метода, известного в данной области, включая BIAcore, как описано в разделе примеры данного документа, с использованием выделенного естественного или рекомбинантного FcRn или подходящего химерного белка/полипептида. В одном примере, аффинность измеряют с использованием внеклеточного домена рекомбинантного человеческого FcRn, как описано в разделе примеры данного документа (SEQ ID NO: 48). В одном примере аффинность измеряют с использованием внеклеточного домена альфа-цепи рекомбинантного человеческого FcRn (SEQ ID NO: 48) вместе с человеческим $\beta 2$ -микроглобулином ($\beta 2M$) (SEQ ID NO: 72). Соответственно, молекулы антител по настоящему изобретению обладают аффинностью связывания к выделенному человеческому FcRn, составляющей примерно 1 нМ или менее. В одном воплощении, молекула антитела по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания, составляющей примерно 500 пМ или менее (т.е. более высокой аффинностью). В одном воплощении, молекула антитела по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания, составляющей примерно 250 пМ или менее. В одном воплощении, молекула антитела по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания, составляющей примерно 200 пМ или менее. В одном воплощении, молекула антитела по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания, составляющей примерно 150 пМ или менее. В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается антитело к FcRn с аффинностью связывания, составляющей примерно 100 пМ или менее. В одном воплощении, в настоящем изобретении предлагается гуманизированное антитело к FcRn с аффинностью связывания, составляющей примерно 100 пМ или менее. В одном воплощении в настоящем изобретении

предлагается антитело к FcRn с аффинностью связывания, составляющей примерно 50 пМ или менее.

В одном воплощении антитела по настоящему изобретению способны связываться с человеческим FcRn как при pH 6 или ниже (конкретно при pH 6), так и при pH 7,4 или выше (конкретно при pH 7,4) со сравнимой аффинностью. Таким образом, предпочтительно, антитела способны продолжать связываться с FcRn даже внутри эндосомы, максимизируя посредством этого блокировку связывания FcRn с IgG.

В одном воплощении антитела по настоящему изобретению способны связываться с человеческим FcRn с аффинностью связывания, составляющей 150 пМ или менее, при измерении при pH 6 и pH 7,4. В одном воплощении антитела по настоящему изобретению способны связываться с человеческим FcRn с аффинностью связывания, составляющей 130 пМ или менее, при измерении при pH 6 и pH 7,4. В одном воплощении антитела по настоящему изобретению способны связываться с человеческим FcRn с аффинностью связывания, составляющей 130 пМ или менее, при измерении при pH 6, и с аффинностью связывания, составляющей 50 пМ или менее, при измерении при pH 7,4.

Аффинность антитела или связывающего фрагмента по настоящему изобретению, а также степень, до которой связывающий агент (такой как антитело) ингибирует связывание, может определяться специалистом в данной области с использованием стандартных методов, например, таких, которые описаны Scatchard et al. (Ann. NY. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)) или с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием таких систем, как BIAcore. Для поверхностного плазмонного резонанса молекулы-мишени иммобилизуют на твердой подложке и экспонируют с лигандами в подвижной фазе, проходящей через проточную ячейку. Если происходит связывание лиганда с иммобилизованной мишенью, то изменяется локальный коэффициент преломления, приводя к изменению угла SPR, которое можно отследить в реальном времени путем детектирования изменений интенсивности отраженного света. Скорость изменения сигнала SPR можно проанализировать с получением констант кажущейся скорости фазы ассоциации и диссоциации реакции связывания. Отношение этих значений соответствует константе кажущегося равновесия (аффинность) (см., например, Wolff et al, Cancer Res. 53:2560-65 (1993)).

В настоящем изобретении аффинность тестируемой молекулы антитела, как правило, определяют с использованием SPR, как указано ниже. Тестируемая молекула антитела захватывается на твердую подложку и внеклеточный домен альфа-цепи человеческого FcRn в нековалентном комплексе с человеческим β 2M проходит в потоке над захваченным антителом в подвижной фазе, и определяют аффинность тестируемой молекулы антитела к человеческому FcRn. Тестируемая молекула антитела может захватываться на твердую подложку поверхности чипа с использованием соответствующего метода, например, с использованием агента захвата, специфичного к анти-Fc или к анти-Fab'. В одном примере аффинность определяют при pH 6. В одном примере аффинность определяют при pH 7,4.

Понятно, что аффинность антител, предлагаемых настоящим изобретением, может изменяться с использованием подходящего метода, известного в данной области. Таким образом, настоящее изобретение также относится к вариантам молекул антитела по настоящему изобретению, которые обладают улучшенной аффинностью к FcRn. Такие варианты могут быть получены с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включающих введение мутаций в CDR (Yang et al, J. Mol. Biol, 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), использование штаммов E.coli с геном-мутатором (Low et al, J. Mol. Biol, 250, 359-368, 1996), ДНК-шаффлинг (Patten et al, Curr. Opin. Biotechnol, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al, J. Mol. Biol, 256, 77-88, 1996) и ПЦР с ДНК-шаффлингом (sexual PCR) (Cramer et al, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al (выше) обсуждают эти методы созревания аффинности.

В одном воплощении молекулы антител по настоящему изобретению блокируют активность человеческого FcRn. Анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать FcRn, описаны в разделе примеры данного документа. Подходящий анализ для определения способности молекулы антитела блокировать рециклинг IgG in vitro описан в данном документе ниже.

Если целесообразно, то антитело для применения в настоящем изобретении может быть конъюгировано с одной или с несколькими эффекторными молекулами. Понятно, что эффекторная молекула может включать единственную эффекторную молекулу или две или более таких молекул, связанных с образованием единственного компонента, который может быть присоединен к антителам по настоящему изобретению. В случае если целесообразно получение фрагмента антитела, связанного с эффекторной молекулой, то этого можно достичь с помощью стандартных химических процедур или методов рекомбинантной ДНК, так что фрагмент антитела будет связан с эффекторной молекулой либо прямо, либо посредством агента конденсации. Методы конъюгации таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см., Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, PH armacology and Therapeutics, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, что описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, в случае, где эффекторная молекула является белком или полипептидом, связь может достигаться с использованием процедур рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP0392745.

Используемый в данном документе термин "эффекторная молекула" включает, например, противоопухолевые агенты, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например, фермен-

ты, другое антитело или фрагменты антитела, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например, ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, особенно радиоiod, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут детектироваться с помощью ЯМР или ЭПР спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические агенты, включающие любой агент, который является вредным (например, убивает их) для клеток. Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтансиноиды, спонгистатины, ризоксин, халихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, ди-гидрокси антрациндон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, тиотепа хлорамбуцил, мелфалан, кармусти (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфид, дибромоманнит, стрептозотин, митомицин C, и цис-дихлордиамин платина (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихимицины или дуокармицины), и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , Висмут 213 , Калифорний 252 , Иридий 192 и Вольфрам 188 /Рений 188 , или лекарственные средства, такие как, в частности, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин. Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Ферменты, представляющие интерес, включают, в частности, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Белки, полипептиды и пептиды, представляющие интерес, включают, в частности, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, ризин А, синегнойный эндотоксин, или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов или тканевой активатор плазминогена, тромботический агент или антиангиогенный агент, например, ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцит макрофаг колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцит колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, используемые, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, позитронно-активные металлы (для использования в позитрон-эмиссионной томографии), и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. См., в основном, патент США No. 4741900 для ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения в качестве диагностиков. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и акворин; и подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом примере эффекторная молекула может повышать период полужизни антитела *in vivo*, и/или уменьшать иммуногенность антитела и/или усиливать доставку антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул данного типа включают полимеры, альбумин, альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, такие как те, что описаны в WO05/117984.

В одном воплощении период полужизни, который обеспечивается эффекторной молекулой, независимой от FcRn, является предпочтительным.

В случае, где эффекторная молекула является полимером, она в общем случае может быть синтетическим или природным полимером, например, необязательно замещенной неразветвленной или разветвленной полиалкиленовой цепью, полиалкениленовым или полиоксиалкиленовым полимером или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Специфические необязательные заместители, которые могут присутствовать в вышеописанных синтетических полимерах, включают одну или несколько гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Специфические примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенные неразветвленные или разветвленные цепи поли(этиленгликоля), поли(пропиленгликоля), поли(винилового спирта) или их производные, особенно необязательно замещенные поли(этиленгликоли), такие как метоксиполи(этиленгликоль) или их производные.

Специфические природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном воплощении, полимером является альбумин или его фрагмент, такой как человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент.

Подразумевается, что используемый в данном документе термин "производные" включает реактивные производные, например, тиолселективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды и тому подобные. Реакционноспособная группа может быть связана непосредственно с полимером или посредством линкерного сегмента. Понятно, что остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в виде связывающей группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера может варьироваться по необходимости, но, как правило, его средняя молекулярная масса находится в диапазоне от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, как например от 20000 до 40000 Да. Размер полимера, конкретно, может быть выбран на основе назначенного применения продукта, например, по способности к локализации в определенных тканях, таких как опухоли, или благодаря повышенному периоду полужизни в кровотоке (для обзора см. Charman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, в случае, где продукт предназначен для ухода из кровотока и проникновения в ткань, например, для применения при лечении опухоли, может быть предпочтительным применение полимера небольшой молекулярной массы, например, около 5000 Да. Для таких применений, где продукт остается в кровотоке, может быть предпочтительным использование полимера с более высокой молекулярной массой, например, в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или их производные, и особенно с молекулярной массой в диапазоне примерно от 15000 примерно до 40000 Да.

В одном примере, антитела для применения в настоящем изобретении присоединены к компонентам поли(этиленгликоля) (ПЭГ). В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела, и ПЭГ-молекулы могут быть присоединены посредством любой доступной функциональной группы аминокислотной боковой цепи или концевой аминокислотной функциональной группы, локализованной в фрагменте антитела, например, любой свободной амино-, имино-, тиольной, гидроксильной или карбоксильной группы. Такие аминокислоты могут иметь природное происхождение в фрагменте антитела или могут быть сконструированы и вставлены во фрагмент с использованием методов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO98/25971, WO2008/038024). В одном воплощении, молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, где модификация представляет собой вставку в C-концевую область его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для возможности соединения с эффекторной молекулой. Соответственно, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Множество сайтов может использоваться для присоединения двух или более молекул ПЭГ.

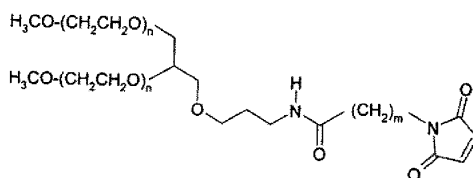
Соответственно, молекулы ПЭГ ковалентно связаны посредством тиольной группы по меньшей мере одного остатка цистеина, локализованного в фрагменте антитела. Каждая полимерная молекула, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы остатка цистеина, локализованного во фрагменте. Ковалентная связь, как правило, представляет собой дисульфидную связь, конкретно, связь сера-углерод. В случае использования тиольной группы в качестве точки присоединения соответственно активированных эффекторных молекул, могут использоваться, например, тиольные селективные производные, такие как малеимиды и производные цистеина. Активированный полимер может использоваться в качестве исходного материала при получении полимер-модифицированных фрагментов антитела, как описано выше. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, содержащий тиольную реакционноспособную группу, такую как галогенкарбоновая кислота или эфир, например, иодоацетамид, имид, например, малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы могут быть получены коммерчески (например, из Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Хантсвилл, Алабама, США) или могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов с использованием стандартных химических процедур. Конкретные ПЭГ-молекулы включают 20К метокси-ПЭГ-амин (получаемый из Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (получаемый из Nektar, ранее Shearwater).

В одном воплощении, антитело представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или diFab, который пэгирован, т.е. содержит ковалентно присоединенный ПЭГ (поли(этиленгликоль)), например, согласно методу, раскрытому в EP 0948544 или EP1090037 [см., также "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545]. В одном примере, ПЭГ присоединяют к цистеину в шарнирной области. В одном примере, Fab-фрагмент, модифицированный с помощью ПЭГ, содержит малеимидную группу, ковалентно связанную с единственной тиольной группой в модифициро-

ванной шарнирной области. Остаток лизина может быть ковалентно связан с малеимидной группой, и к каждой из аминокрупп на остатке лизина может быть присоединен полимер метоксиполи(этиленгликоль), имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Суммарная молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может, таким образом, составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретные молекулы ПЭГ включают лизин, модифицированный с помощью 2-[3-(N-малеимид)пропионамид]этиламин N,N'-бис(метоксиполи(этиленгликоля) MW 20000), также известный как PEG2MAL40K (получаемый из Nektar, ранее Shearwater).

Альтернативные источники ПЭГ-линкеров включают NOF, которые поставляют GL2-400MA3 (где m в структуре ниже составляет 5) и GL2-400MA (где m составляет 2), и n составляет приблизительно 450:

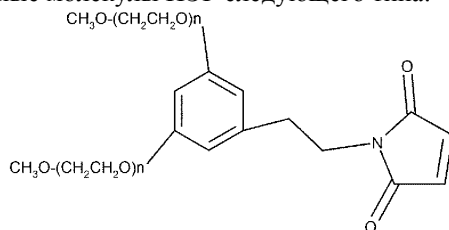


m составляет 2 или 5

То есть молекулярная масса каждого ПЭГ составляет приблизительно 20000 Да.

Таким образом, в одном воплощении ПЭГ представляет собой 2,3-Бис(метитполиоксиэтилен-окси)-1-[[3-(6-малеимида-1-оксогексил)амино]пропилокси]гексан (разветвленный на две цепи ПЭГ, $(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{-MAL}$, Mw 40000, известный как SUNBRIGHT GL2-4 00MA3).

Дополнительные эффекторные молекулы ПЭГ следующего типа:



доступны из Dr Reddy, NOF и Jenkem.

В одном воплощении предлагается антитело, которое является пэгиллированным (например, с помощью ПЭГ, описанного в данном документе), где ПЭГ присоединен посредством цистеинового аминокислотного остатка в аминокислотном положении цепи, соответствующем 232, или около него, например, в аминокислоте 232 тяжелой цепи (с последовательной нумерацией), например, в аминокислоте 232 последовательности SEQ ID NO: 33.

В одном воплощении настоящего изобретения предлагается молекула Fab'-ПЭГ, содержащая один или несколько полимеров ПЭГ, например, 1 или 2 полимера, такие как полимер 40 кДа или полимеры.

Молекулы Fab'-ПЭГ согласно настоящему изобретению могут быть особенно предпочтительными из-за того, что их период полужизни не зависит от Fc-фрагмента. В одном примере в настоящем изобретении предлагается способ лечения заболевания, ослабленного с помощью блокировки человеческого FcRn, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к FcRn или его связывающего фрагмента, где антитело или его связывающий фрагмент имеет период полужизни, который не зависит от связывания Fc с FcRn.

В одном воплощении, предлагается Fab', конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина.

В одном воплощении, предлагается scFv, конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина.

В одном воплощении, антитело или его фрагмент конъюгированы с молекулой крахмала, например, для повышения периода полужизни. Методы конъюгации крахмала с белком описаны в US 8017739, который включен в данный документ ссылкой.

В одном воплощении предлагается молекула, связывающая FcRn (т.е. антитело или его связывающий фрагмент), которая:

вызывает 50-85% уменьшение, как например, более 70% уменьшения концентрации IgG в плазме, вызывает не более чем 25% или 20% уменьшение концентрации альбумина в плазме, и/или имеет возможность повторного дозирования для достижения продолжительного сохранения низкой концентрации IgG в плазме.

В настоящем изобретении также предлагается выделенная последовательность ДНК, кодирующая тяжелую и/или легкую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению. Соответственно, последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению. Последовательность ДНК по настоящему изобретению может включать синтетическую ДНК, например,

полученную химическим процессингом, кДНК, геномную ДНУ или любую их комбинацию.

ДНК-последовательности, которые кодируют молекулу антитела по настоящему изобретению, могут быть получены с помощью методов, хорошо известных специалисту в данной области. Например, ДНК-последовательности, кодирующие часть или целую тяжелую и легкую цепь, могут быть синтезированы, если целесообразно, из определенных ДНК-последовательностей или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

ДНК, кодирующая акцепторные каркасные последовательности, широкодоступна специалистам в данной области и может легко синтезироваться на основе их известных аминокислотных последовательностей.

Стандартные методы молекулярной биологии могут использоваться для получения ДНК-последовательностей, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Целевые ДНК-последовательности могут быть синтезированы полностью или частично с использованием методов олигонуклеотидного синтеза. При необходимости могут использоваться методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В данном документе представлены примеры подходящих ДНК-последовательностей.

Примеры подходящих ДНК-последовательностей, кодирующих переменную область легкой цепи 1638.g49, представлены в последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21.

Примеры подходящих ДНК-последовательностей, кодирующих переменную область легкой цепи 1638.g28, представлены в последовательности SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 54.

Примеры подходящих ДНК-последовательностей, кодирующих переменную область тяжелой цепи 1638.g49, представлены в последовательности SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28.

Примеры подходящих ДНК-последовательностей, кодирующих переменную область тяжелой цепи 1638.g28, представлены в последовательности SEQ ID NO: 60 и 62.

Примеры подходящих ДНК-последовательностей, кодирующих легкую цепь (переменный и константный домены) 1638.g49, представлены в последовательности SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24 и для легкой цепи 1638.g28 последовательность представлена в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, и для тяжелой цепи 1638.g28 последовательность представлена в SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 66.

Примеры подходящих ДНК-последовательностей, кодирующих тяжелую цепь 1638.g49 (переменный и константный домены в зависимости от формата), представлены в SEQ ID NO: 30 (Fab), SEQ ID NO: 34 или 36 (Fab'), SEQ ID NO: 38 (IgG4P), SEQ ID NO: 43 (FabFv) и SEQ ID NO: 74 (IgG1).

Соответственно, в одном примере настоящего изобретения предлагается вставленная ДНК-последовательность, кодирующая тяжелую цепь Fab- или Fab'-фрагмента антитела по настоящему изобретению, которая включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 32, 34, 36, 64 или 66. Также предлагается выделенная ДНК-последовательность, кодирующая легкую цепь Fab-или Fab'-фрагмента антитела по настоящему изобретению, которая включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, 22 или 56.

В одном примере настоящего изобретения предлагается выделенная ДНК-последовательность, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела IgG4(P) по настоящему изобретению, в котором ДНК, кодирующая тяжелую цепь, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и ДНК, кодирующая легкую цепь, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В одном примере в настоящем изобретении предлагается выделенная ДНК-последовательность, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела IgG1 по настоящему изобретению, в котором ДНК, кодирующая тяжелую цепь, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, и ДНК, кодирующая легкую цепь, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В одном примере настоящего изобретения предлагается выделенная ДНК-последовательность, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела Fab-dsFv по настоящему изобретению, в котором ДНК, кодирующая тяжелую цепь, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, и ДНК, кодирующая легкую цепь, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

Настоящее изобретение также относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему одну или несколько ДНК-последовательностей по настоящему изобретению. Соответственно, предлагается клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий одну или несколько ДНК-последовательностей, кодирующих антитело по настоящему изобретению. Соответственно, клонирующий или экспрессирующий вектор содержит две ДНК-последовательности, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению, соответственно, и подходящие сигнальные последовательности. В одном примере вектор содержит межгенную последовательность между тяжелой и легкой цепями (см. WO03/048208).

Общие методы, с помощью которых конструировали векторы, методы трансфекции и культивирования также известны специалистам в данной области. В этом отношении сделана ссылка на "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York, и Maniatis Manual, Cold Spring Harbor Publishing.

Также предлагается клетка-хозяин, содержащая один или несколько клонирующих или экспресси-

рующих векторов, включающих одну или несколько ДНК-последовательностей, кодирующих антитело по настоящему изобретению.

Соответственно, в настоящем изобретении также предлагается клетка-хозяин для экспрессии антитела согласно изобретению, содержащая:

- i) ДНК-последовательность, кодирующую тяжелую цепь указанного антитела, и
- ii) ДНК-последовательность, кодирующую легкую цепь указанного антитела,

где ДНК-последовательности представлены в одном или в нескольких клонирующих или экспрессирующих векторах.

Любая подходящая система клетка-хозяин/вектор может использоваться для экспрессии ДНК-последовательностей, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Может использоваться бактериальная система, например *E.coli*, а также другие микробные системы (особенно для экспрессии фрагментов антитела), или также могут использоваться эукариотические системы экспрессии, например, клетки-хозяева млекопитающих (особенно для экспрессии полноразмерных антител). Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают клетки CHO, миеломные или гибридомные клетки.

Подходящие типы клеток из яичников китайского хомяка (CHO-клетки) для применения в настоящем изобретении могут включать клетки CHO и CHO-K1, включающие клетки dhfr- CHO, такие как CHO-DG44 и CHO-DXB11, которые могут использоваться вместе с маркером селекции DHFR, или клетки CHOK1-SV, которые могут использоваться вместе с маркером селекции глутамин синтетазой. Другие типы клеток для использования в экспрессии антител включают лимфоцитарные клеточные линии, например, миеломные клетки NSO и клетки SP2, клетки COS.

В настоящем изобретении также предлагается способ получения молекулы антитела по настоящему изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор или векторы по настоящему изобретению, при условиях, подходящих для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела может содержать только полипептид тяжелой цепи или только легкой цепи, в этом случае только последовательность, кодирующая полипептид тяжелой цепи или только легкой цепи необходима для трансфекции клеток-хозяев. Для получения продуктов, содержащих обе цепи - тяжелую и легкую, клеточная линия может быть трансфицирована двумя векторами, причем первый вектор кодирует полипептид легкой цепи, а второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, может использоваться единственный вектор, включающий последовательности, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь.

Антитела и фрагменты согласно настоящему изобретению экспрессируются из клеток-хозяев на хорошем уровне. Таким образом, свойства антител и/или фрагментов способствуют коммерческому процессированию.

Таким образом, предлагается способ культивирования клетки-хозяина и экспрессии антитела или его фрагмента, выделения последних и необязательно очистки с получением выделенного антитела или его фрагмента. В одном воплощении, способ дополнительно включает стадию конъюгации эффекторной молекулы с выделенным антителом или с его фрагментом, например, конъюгации с полимером ПЭГ, конкретно, как описано в данном документе.

В одном воплощении, предлагается способ очистки антитела (конкретно, антитела или его фрагмента согласно изобретению), включающий стадии: осуществления анионо-обменной хроматографии несвязывающего типа, так что примеси остаются на колонке, а антитело элюируется.

В одном воплощении, для очистки применяется аффинный захват на FcRn-колонке.

В одном воплощении для очистки применяется цибакрон голубой или аналогичный краситель для очистки химерных молекул с альбумином или конъюгатов.

Подходящие ионообменные смолы для применения в способе включают смолу Q.FF (поставляется GE-Healthcare). Стадия может, например, осуществляться при pH примерно 8.

Способ может дополнительно включать исходную стадию захвата, применяющую катионо-обменную хроматографию, осуществляемую при pH примерно 4-5, как например, 4,5. Катионо-обменная хроматография может, например, применять смолу, такую как CarptoS или SP сефарозу FF (поставляется GE-Healthcare). Антитело или его фрагмент могут затем элюироваться со смолы с применением солевого раствора, такого как хлорид натрия, например, при концентрации 200 mM.

Таким образом, при необходимости стадия или стадии хроматографии могут включать одну или несколько стадий промывки.

Способ очистки также может включать стадии фильтрации, как например, стадию диафильтрации.

Таким образом, в одном воплощении, предлагается очищенное антитело к FcRn или его фрагмент, например, гуманизированное антитело или фрагмент, конкретно антитело или фрагмент согласно изобретению по существу в очищенной форме, конкретно, свободное или по существу свободное от эндотоксина и/или белка клетки-хозяина или ДНК.

Подразумевается, что используемый выше термин "очищенная форма" относится по меньшей мере к 90% чистоты, как например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% мас./мас. или более чистоты.

Подразумевается, что "по существу свободный от эндотоксина", как правило, относится к содержа-

нию эндотоксина 1 EU на 1 мг продукта антитела или менее, как например, 0,5 или 0,1 EU на 1 мг продукта.

Подразумевается, что "по существу свободный от белка клетки-хозяина или от ДНК", как правило, относится к содержанию белка клетки-хозяина и/или ДНК, которое составляет 400 пг на 1 мг продукта антитела или менее, как например, 100 пг на 1 мг или менее, конкретно, 20 пг на 1 мг, соответственно.

Молекулы антител по настоящему изобретению также могут использоваться для диагностики, например, при *in vivo* диагностике и визуализации болезненных состояний, включающих FcRn.

Антитела по настоящему изобретению применяются для лечения и/или профилактики патологического состояния, в настоящем изобретении также предлагаются фармацевтические или диагностические композиции, включающие молекулу антитела по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или носителями. Соответственно, предлагается применение молекулы антитела по изобретению для получения лекарственного средства. Композиция обычно поставляется в виде части стерильной фармацевтической композиции, которая стандартно включает фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предлагается способ получения фармацевтической или диагностической композиции, включающий введение и смешивание молекулы антитела по настоящему изобретению вместе с одним или с несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или носителями.

Молекула антитела может представлять собой единственный активный ингредиент в фармацевтической или в диагностической композиции или ей могут сопутствовать другие активные ингредиенты, включающие другие ингредиенты, такие как стероиды или другие лекарственные молекулы, конкретно, лекарственные молекулы, чей период полужизни независим от связывания FcRn.

Фармацевтические композиции соответственно включают терапевтически эффективное количество антитела по изобретению. Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического агента, которое необходимо для лечения, ослабления или предотвращения целевого заболевания или патологического состояния, или для демонстрации детектируемого или превентивного эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество можно исходно оценить либо с помощью культурального анализа, или с помощью животных моделей, обычно грызунов, кроликов, собак, свиней или приматов. Животная модель также может использоваться для определения соответствующего диапазона концентрации и пути введения. Такую информацию можно затем использовать для определения подходящих доз и путей введения людям.

Точное терапевтически эффективное количество для объекта-человека будет зависеть от тяжести болезненного состояния, общего состояния здоровья объекта, возраста, массы тела и пола объекта, диеты, времени и частоты введения, лекарственной комбинации(й), чувствительности реакции и восприимчивости/ответа на терапию. Это количество может определяться с помощью стандартного эксперимента, что находится в компетенции врача. Как правило, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например, 0,1 мг/кг - 200 мг/кг, как например, 100 мг/кг.

Фармацевтические композиции могут быть представлены стандартным образом в единых лекарственных формах, содержащих определенное количество активного агента по изобретению на одну дозу.

Терапевтические дозы антител согласно настоящему изобретению демонстрируют отсутствие видимых токсикологических эффектов *in vivo*.

В одном воплощении антитела или фрагмента согласно изобретению однократная доза может обеспечивать до 70% уменьшения уровня IgG в кровотоке. В одном примере антитела или фрагмента согласно изобретению однократная доза может обеспечивать до 80% уменьшения уровня IgG в кровотоке. В одном примере антитела или фрагмента согласно изобретению однократная доза может обеспечивать более чем 80% уменьшения уровня IgG в кровотоке.

Максимальное терапевтическое уменьшение IgG в кровотоке может наблюдаться примерно через 1 неделю после введения соответствующей терапевтической дозы. Уровень IgG может восстанавливаться в течение около недель после дозирования, если при этом не вводились дополнительные терапевтические дозы. Применяемый в данном документе термин "восстановление" относится к возвращению уровня до значений, наблюдавшихся перед началом исходного дозирования.

Предпочтительно уровень IgG *in vivo* может сохраняться на соответствующем низком уровне с помощью введения последовательных доз антитела или фрагмента согласно изобретению.

Композиции могут вводиться пациенту индивидуально или могут вводиться в комбинации (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими агентами, лекарственными средствами или с гормонами.

Применяемый в данном документе термин "агенты" относится к компоненту, который при введении оказывает физиологическое воздействие.

Применяемый в данном документе термин "лекарственное средство" относится к химическому компоненту, который в терапевтической дозе оказывает соответствующее физиологическое воздействие.

В одном воплощении антитела или фрагменты согласно настоящему изобретению применяют вместе с иммуноподавляющей терапией, такой как стероиды, конкретно преднизон.

В одном воплощении антитела или фрагменты согласно настоящему изобретению применяются вместе с Ритуксимаб или с другими В-клеточными терапиями.

В одном воплощении антитела или фрагменты согласно настоящему изобретению применяются вместе с любым агентом, модулирующим В-клетки или Т-клетки, или с иммуномодулятором. Примеры включают метотрексат, микрофениолат и азатиоприн.

Доза, в которой вводят молекулу антитела по настоящему изобретению, зависит от характера патологического состояния, которое подвергается лечению, степени присутствующего воспаления и от того используется ли молекула антитела для профилактики или для лечения существующего патологического состояния.

Частота дозирования будет зависеть от периода полужизни антитела, его расположения, опосредованного мишенью, продолжительностью эффекта и присутствием антител к лекарственным средствам. Если антитело имеет короткий период полужизни (несколько часов) или ограниченную активность и/или если целесообразна доставка небольших объемов лекарственного средства (например, для подкожной инъекции), то может потребоваться частое дозирование, настолько частое, как один или более раз в день. Альтернативно, если антитело имеет длительный период полужизни, обладает продолжительной активностью или может дозироваться в больших объемах (как например, с помощью инфузии), то дозирование может быть нечастым, раз в день или каждые несколько дней, недель или месяцев. В одном воплощении, между дозами дается достаточно времени, чтобы была возможность уменьшения уровня антитела к лекарственному средству.

Подразумевается, что используемый в данном документе термин "период полужизни" относится к периоду существования молекулы в кровотоке, например, в сыворотке/плазме.

Применяемый в данном документе термин "фармакодинамика" относится к профилю и, конкретно, к продолжительности биологического действия молекулы согласно настоящему изобретению.

Фармацевтически приемлемый носитель не должен сам вызывать продуцирование антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящие носители могут представлять собой крупные медленно метаболизирующиеся макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолиевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и инактивированные вирусные частицы.

Могут использоваться фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Дополнительно, в такой композиции могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажнители или эмульгаторы или регулирующие pH буферные вещества. Такие носители дают возможность фармацевтическим композициям быть включенным в состав в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, густых суспензий и суспензий для потребления пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, подходящие для парентерального введения, например, с помощью инъекции или инфузии, например, с помощью болюсной инъекции или продолжительной инфузии. В случае, когда продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может принимать форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или в водном носителе, и он может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие агенты, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, молекула антитела может быть представлена в сухой форме для восстановления перед использованием с помощью подходящей стерильной жидкости.

После смешивания композиции по изобретению можно вводить непосредственно объекту. Объектами, которых подвергают лечению, могут быть животные. Однако в одном или в нескольких воплощениях композиции адаптированы для введения объекту-человеку.

Соответственно, в составах согласно настоящему изобретению pH конечного состава не совпадает со значением изоэлектрической точки антитела или фрагмента, например, если pI белка находится в диапазоне 8-9 или выше, то pH состава, равное 7, может быть подходящим. Не будучи связанными теорией, полагают, что это, в конечном счете, может обеспечить получение конечного состава с улучшенной стабильностью, например, когда антитело или фрагмент сохраняется в растворе.

В одном примере фармацевтический состав при pH в диапазоне 4-7 включает: 1-200 мг/мл молекулы антитела согласно настоящему изобретению, 1-100 мМ буфера, 0,001-1% поверхностно активного вещества, а) 10-500 мМ стабилизатора, б) 10-500 мМ стабилизатора и 5-500 мМ агента тоничности, или с) 5-500 мМ агента тоничности.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены любыми путями, включая, без ограничения перечисленным, пероральные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, костномозговые, интратекальные, внутрижелудочковые, трансдермальные, чрескожные (например, см. WO98/20734), подкожные, внутрибрюшинные, интраназальные, энтеральные, местные,

подъязычные, интравагинальные или ректальные пути введения. Безыгольные инъекторы также могут использоваться для введения фармацевтических композиций по изобретению. Как правило, терапевтические композиции могут быть получены в виде инъектируемых растворов, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией.

Прямая доставка композиций будет, как правило, осуществляться посредством инъекции, подкожно, внутривенно, внутримышечно, или доставка осуществляется в межтканевое пространство. Композиции также могут быть введены в пораженный участок. Лечение с использованием дозировок может представлять собой схему однократного дозирования или схему многократного дозирования.

Понятно, что активный ингредиент в композиции представляет собой молекулу антитела. Как таковой он будет восприимчив к деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию следует вводить с помощью пути с использованием желудочно-кишечного тракта, то композиция должна будет содержать агенты, которые защищают антитела от деградации, но которые высвобождают антитела из желудочно-кишечного тракта после всасывания.

Детальное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном воплощении, состав предлагается в виде состава для местного введения, включающего ингаляцию.

Подходящие препараты для ингаляции включают порошки для ингаляции, дозированные аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или растворы для ингаляции, свободные от газов-пропеллентов. Порошки для ингаляции согласно изобретению, содержащие активное вещество, могут состоять только из вышеупомянутых активных веществ или из смеси вышеупомянутых активных веществ вместе с физиологически приемлемым вспомогательным веществом.

Эти порошки для ингаляции могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Соответственно, используют моно- или дисахариды, такие как лактоза или глюкоза, особенно, но не исключительно в форме их гидратов.

Для частиц, которые депонируются в легких, требуется размер менее чем 10 микрон, как например, 1-9 микрон, например, от 1 до 5 мкм. Размер частиц активного ингредиента (такого как антитело или его фрагмент) имеет первостепенное значение.

Газы-пропелленты, которые могут использоваться для приготовления аэрозолей для ингаляции, известны в данной области. Подходящие газы-пропелленты выбирают из числа углеводородов, таких как n-пропан, n-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеупомянутые газы-пропелленты могут использоваться сами по себе или в виде их смесей.

Особенно подходящие газы-пропелленты представляют собой галогенированные производные алканов, выбранные из числа TG11, TG12, TG134a и TG227. Из вышеупомянутых галогенированных углеводородов особенно подходящими являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси.

Аэрозоли для ингаляции, содержащие газы-пропелленты, также могут содержать другие ингредиенты, такие как ко-растворители, стабилизаторы, поверхностно-активные агенты (ПАВ), антиоксиданты, смазывающие агенты и средства для приведения pH. Все эти ингредиенты известны в данной области.

Аэрозоли для ингаляции, содержащие газы-пропелленты, согласно изобретению могут содержать до 5 мас.% активного вещества. Аэрозоли согласно изобретению содержат, например, 0,002-5 мас.%, 0,01-3 мас.%, 0,015-2 мас.%, 0,1-2 мас.%, 0,5-2 мас.% или 0,5-1 мас.% активного ингредиента.

Альтернативно, местные введения в легкое также могут представлять собой введение состава в виде жидкого раствора или суспензии, например, с применением устройства, такого как небулайзер, например, небулайзер, соединенный с компрессором (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master(R), произведенный Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, Вирджиния.).

Антитело по изобретению может быть доставлено будучи диспергированным в растворителе, например, в форме раствора или суспензии. Оно может быть суспендировано в подходящем физиологическом растворе, например, в солевом растворе или в другом фармакологически приемлемом растворителе или в буферном растворе. Примеры буферных растворов, известные в данной области, могут содержать 0,05-0,15 мг динатрий эдетата, 8-9 мг NaCl, 0,15-0,25 мг полисорбата, 0,25-0,3 мг безводной лимонной кислоты и 0,45-0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды с достижением pH примерно 4-5. Для суспензии может применяться, например, лиофилизированное антитело.

Составы в виде терапевтических суспензий или растворов также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сы-

вороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомах или биodeградируемых микросферах. Состав, как правило, будет обеспечиваться, по существу, в стерильной форме с применением стерильного способа получения.

Это может включать получение и стерилизацию путем фильтрации буферного растворителя/раствора, используемого для состава, асептическое суспендирование антитела в стерильном растворе буферного растворителя и разлив состава в стерильную тару с помощью методов, знакомых специалистам в данной области.

Составы для распыления согласно настоящему изобретению могут обеспечиваться, например, в виде форм с однократной дозой (например, запечатанные пластиковые контейнеры или флаконы), упакованных фольгой. Каждый флакон содержит однократную дозу в объеме, например, 2 мл растворителя/буферного раствора.

Антитела, раскрытые в данном документе, могут быть пригодны для доставки посредством распыления.

Также предусмотрено, что антитело по настоящему изобретению может вводиться с использованием генной терапии. Чтобы этого достичь, ДНК-последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепь молекулы антитела под контролем подходящих ДНК-компонентов, вводят пациенту так, чтобы цепи антитела экспрессировались с ДНК-последовательностей и происходила их сборка *in situ*.

В настоящем изобретении также предлагается молекула антитела (или композиции, ее содержащие) для применения для контроля таких заболеваний как аутоиммунное заболевание, например, острый рассеянный энцефаломиелит (ADEM), острый некротический геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммаглобулинемия, гнездная алопеция, амилоидоз, ANCA-ассоциированный васкулит, анкилозирующий спондилит, анти-GBM/Анти-ГВМ нефрит, антифосфолипидный синдром (APS), аутоиммунная ангиодистрофия, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунная дизавтономия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (АТП), аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутоиммунная крапивница, аксональная & NAL невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатия, болезнь Каслман, целиакия, болезнь Шагаса, хронические воспалительные демиелинизирующие полиневропатии (CIPD), хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), синдром Чарга-Стросса, рубцовый пемфигоид/доброкачественный пемфигоид слизистой, болезнь Крона, синдром Коганс, холодная болезнь агглютининов, врожденная блокада сердца, Коксаки миокардит, болезнь CREST, наследственная смешанная криоглобулинемия, демиелинизирующие невропатии.

Дерматит герпетический, дерматомиозит, болезнь Девич (оптиконевромиелит), дилатационная кардиомиопатия, дискоидная волчанка, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный ангиоцентрический фиброз, эозинофильный фасциит, эритема, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, синдром Эванса, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом (GPA) см. Вегенера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическая анемия, пурпура Шенлейна-Геноха, Герпес в период беременности, гипогаммаглобулинемия, идиопатический гипокомплементемический тубулоинтерстициальный нефрит, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), IgA-нефропатии, IgG4-связанные заболевания, IgG4-связанные склерозирующие заболевания, иммунорегуляторные липопротеины, воспалительная аортальная аневризма, воспалительная псевдоопухоль, тела включения миозит, инсулинозависимый диабет (тип 1), интерстициальный цистит, артрит ювенильный, ювенильный диабет, синдром Кавасаки, опухоль Кутнера, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, лишай склероатрофический, деревянистый конъюнктивит, линейный IgA-зависимый дерматоз (ЛАД), волчанка (SLE), болезнь Лайма, хронический медиастанальный фиброз, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит, синдром Микулича, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), разъедающая язва роговицы, болезнь Муха-Хаберманн, мультифокальный фибросклероз, рассеянный склероз, миастения, миозит, нарколепсия, оптиконевромиелит (Девич), нейтропения, глазной рубцовой пемфигоид, неврит зрительного нерва, болезнь Ормонда (забрюшинный фиброз), палиндромный ревматизм, PANDAS (детские аутоиммунные нервно-психические расстройства, связанные со стрептококком), паранеопластическая дегенерация мозжечка, парапротеин-полинейропатии, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (НПГ), синдром Парри Ромберга, синдром Парсоннаж-Тернера, Paps planitis (периферийный увеит), пузырчатка обыкновенная, периаотит, периаартериит, периферическая нейропатия, перивенозная энцефаломиелит, злокачественная анемия, синдром РОEMS, узелковый полиартрит, тип I, II, и III аутоиммунные полигландулярные синдромы, полимиалгия ревматическая, полимиозит, синдром постинфарктный, посткардиотомный синдром, прогестероновый дерматит, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориагический артрит, идиопатический легочный фиброз, пиодермия гангренозная, ИЭЦА, феномен Рейно, рефлекторная симпатическая дистрофия, синдром Рейтера, возвратный полихон-

дрит, синдром беспокойных ног, забрюшинный фиброз (болезнь Ормонда), ревматизм, ревматоидный артрит, тиреоидит Риделя, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермия, синдром Шегрена, аутоиммунитет к антигенам спермы и тестикул, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическая офтальмия, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), синдром Толоса-Хант, поперечный миелит, язвенный колит, недифференцированные заболевания соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, везикулобуллезный дерматоз, Витилиго, макроглобулинемия Вальденстрема, идиопатическая гемолитическая анемия с тепловыми антителами и гранулематоз Вегенера (теперь называется гранулематоз с полиангиитом (GPA)).

Дополнительные показания к применению также могут включать синдром повышенной вязкости крови; криоглобулинемию; рецидивирующий фокальный и сегментный гломерулосклероз в трансплантированной почке; синдром HELLP; болезнь Рефсума; ВИЧ-ассоциированную невропатию; рабдомиолиз и аллоиммунные заболевания.

В одном воплощении, антитела или фрагменты согласно изобретению применяют при лечении или профилактике эпилепсии или пароксизма.

В одном воплощении, антитела или фрагменты согласно изобретению применяют при лечении или профилактике рассеянного склероза.

В одном воплощении, антитела или фрагменты согласно изобретению применяют при аллоиммунных заболеваниях/показаниях, которые включают:

трансплантацию от несовместимого донора из-за антител к HLA;

фетальную и неонатальную тромбоцитопению, FNAIT (или неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения, NAITP или NAIT или NAT, или аллоиммунная тромбоцитопения плод-мать, FMAITP или FMAIT).

Дополнительные показания к применению включают быстрое выведение Fc-содержащих биофармацевтических лекарственных средств у пациентов-людей и комбинация терапии антител к FcRn с другими терапиями - IVIg, Ритуксан, плазмаферез. Например, терапия с антителом к FcRn может применяться после терапии с использованием Ритуксана. Кроме того, терапия с использованием антитела к FcRn может использоваться для быстрого выведения визуализирующих агентов, таких как радиоактивно меченные антитела, используемые при визуализации опухолей.

В одном воплощении антитела и фрагменты по изобретению применяют при неврологических заболеваниях, таких как

хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP);

синдром Гийена - Барре;

парапротеинемические полинейропатии;

оптикомиелит (NMO, NMO спектральные расстройства или NMO спектральные заболевания) и миастения гравис.

В одном воплощении антитела и фрагменты по изобретению применяют при дерматологических расстройствах, таких как

буллезный пемфигоид;

обыкновенная пузырчатка;

ANCA-ассоциированный васкулит;

дилатационная кардиомиопатия.

В одном воплощении, антитела и фрагменты по изобретению применяют при иммунологических, гематологических расстройствах, таких как

идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП);

тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП);

идиопатическая гемолитическая анемия с тепловыми антителами;

синдром Гудпасчера;

трансплантация от несовместимого донора из-за антител к HLA.

В одном воплощении расстройство выбирают из следующих: миастения гравис, оптиконеуромиелит, CIDP, синдром Гийом-Барре, парапротеин-полинейропатия, рефракторная эпилепсия, ИТП/ТТП, гемолитическая анемия, синдром Гудпасчера, ABO несоответствие, волчаночный нефрит, почечный васкулит, склеродерма, фиброзирующий альвеолит, дилатационная кардиомиопатия, болезнь Грейвса, диабет типа 1, аутоиммунный диабет, пузырчатка, склеродерма, волчанка, ANCA васкулит, дерматомиозит, болезнь Шегрена и ревматоидный артрит.

В одном воплощении расстройство выбирают из следующих: аутоиммунный полиэндокринный синдром типа 1 (АРЕСЕС или синдром Уитакера) и 2 (синдром Шмидта); алопеция; миастенический криз; щитовидный криз; заболевания щитовидной железы, ассоциированные с щитовидной железой; энцефалит и/или энцефалопатия, связанные с аутоантителами; пузырчатка листовидная; буллезный эпидермолиз; герпетический дерматит; хорея Сиденхэм; острая моторная аксональная нейропатия (AMAN); синдром Миллера-Фишера; мультифокальная моторная невропатия (ММН); опсоклонус; воспалительная

миопатия; синдром Исаака (аутоиммунная невромиотония), паранеопластические синдромы и лимбический энцефалит.

Антитела и фрагменты по настоящему изобретению могут применяться при лечении или профилактике.

В настоящем изобретении также предлагается способ уменьшения концентрации нежелательных антител у индивидуума, включающий стадии введения индивидууму терапевтически эффективной дозы антитела к FcRn или его связывающего фрагмента, описанного в данном документе.

В настоящем изобретении дополнительно предлагается применение молекулы антитела согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики патологического расстройства, описанного в данном документе, такого как аутоиммунное заболевание.

В одном воплощении настоящее изобретение включает применение антител или их фрагментов в качестве реагентов для диагностики, например, антител или их фрагментов, конъюгированных с репортерной молекулой. Таким образом, предлагается антитело или фрагмент согласно изобретению, которое является меченым. В одном аспекте предлагается колонка, содержащая антитела или фрагмент согласно изобретению.

Таким образом, предлагается антитело к FcRn или его связывающий фрагмент для применения в качестве реагента для таких применений как:

1) очистка белка FcRn (или его фрагментов) конъюгированного с матрицей и используемого в качестве аффинной колонки или (в качестве модифицированной формы антитела к FcRn), в качестве осаждающего агента (например, в качестве формы, модифицированной с использованием домена, распознаваемого другой молекулой, которая может быть модифицирована путем добавления Fc (или полученной в виде полноразмерного IgG), который необязательно осаждается с помощью реагента антитела к Fc);

2) детектирование и/или количественная оценка FcRn на клетках или в клетках, живых или фиксированных (клетки *in vitro* или *in vivo* в тканевых или в клеточных срезах). Такое применение может включать количественную оценку FcRn в качестве биомаркера для отслеживания эффекта обработки антителом к FcRn. Для этих целей кандидат может использоваться в модифицированной форме (например, путем добавления Fc-домена как в полноразмерном IgG, или некоторых других компонентов в качестве генетически сшитого белка или химического конъюгата, как например добавление флуоресцентной метки, используемой для целей детектирования);

3) очистка или сортировка FcRn-несущих клеток, меченных путем связывания с кандидатом, модифицированными способами, приведенными в (1) и (2).

Также в настоящем изобретении предлагается анализ, подходящий для оценки способности тестируемой молекулы, такой как молекула антитела, блокировать активность FcRn и, конкретно, способности клеток к рециклингу IgG. Такой анализ может использоваться для идентификации ингибиторов активности FcRn, таких как молекулы антител или небольшие молекулы, и, как таковой, он может использоваться в качестве серийного анализа при получении такого ингибитора.

В одном аспекте предлагается анализ, подходящий для оценки способности тестируемой молекулы, такой как молекула антитела, блокировать активность человеческого FcRn и, конкретно, способность человеческого FcRn осуществлять рециклинг IgG, где способ включает стадии:

a) нанесения на поверхность покрытия в виде клеток млекопитающих, но не человека, рекомбинантно экспрессирующих альфа-цепь человеческого FcRn и человеческий $\beta 2$ -микро глобулин ($\beta 2M$),

b) контакт клеток при слабо кислых условиях, как например, при pH примерно 5,9 с тестируемой молекулой и с IgG для рециклинга клеткой, в течение периода времени, достаточного для возможности связывания как тестируемой молекулы, так и IgG с FcRn, необязательно добавление тестируемой молекулы перед IgG для рециклинга, и инкубирование в течение периода времени, достаточного для возможности связывания тестируемой молекулы с FcRn;

c) промывка с использованием слабо кислого буфера и

d) детектирование количества IgG, интернализированного и/или подвергнутого рециклингу клетками.

В одном аспекте предлагается анализ, подходящий для оценки способности тестируемой молекулы, такой как молекула антитела, блокировать активность человеческого FcRn и, конкретно, способность человеческого FcRn к рециклингу IgG, где способ включает стадии:

a) нанесения на поверхность покрытия в виде клеток млекопитающих, но не человека, рекомбинантно экспрессирующих альфа-цепь человеческого FcRn и человеческий $\beta 2$ -микроглобулин ($\beta 2M$),

b) контакт клеток при слабо кислых условиях, как например, при pH примерно 5,9 с тестируемой молекулой антитела и с IgG для рециклинга клеткой, в течение периода времени, достаточного для возможности связывания как тестируемой молекулы, так и IgG с FcRn, необязательно добавление тестируемой молекулы перед IgG для рециклинга, и инкубирование в течение периода времени, достаточного для возможности связывания тестируемой молекулы с FcRn;

c) промывка с использованием слабо кислого буфера для удаления несвязанного IgG и тестируемой молекулы антитела, и

d) детектирование количества IgG, подвергнутого клетками рециклингу.

В одном аспекте предлагается анализ подходящий для оценки способности тестируемой молекулы,

такой как молекула антитела, блокировать активность человеческого FcRn и, конкретно, способность человеческого FcRn к рециклингу IgG, где способ включает стадии:

- a) нанесения на поверхность покрытия в виде клеток млекопитающих, но не человека, рекомбинантно экспрессирующих альфа-цепь человеческого FcRn и $\beta 2$ -человеческий микроглобулин ($\beta 2M$);
- b) контакт клеток при слабо кислых условиях, как например, при pH примерно 5,9 с тестируемой молекулой антитела и с IgG для рециклинга клеткой, в течение периода времени, достаточного для возможности связывания как тестируемой молекулы, так и IgG с FcRn, необязательно добавление тестируемой молекулы перед IgG для рециклинга, и инкубирование в течение периода времени, достаточного для возможности связывания тестируемой молекулы с FcRn;
- c) промывка с использованием слабо кислого буфера для удаления несвязанного IgG и тестируемой молекулы антитела;
- d) инкубирование клеток в нейтральном буфере, как например, при pH примерно 7,2;
- e) детектирование количества IgG, подвергнутого клетками рециклингу, путем определения количества IgG, высвобождаемого в надосадочную жидкость.

Подходящие клетки включают клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) II. Трансфекция клеток MDCKII альфа-цепью человеческого FcRn и человеческим $\beta 2$ -микро глобулином ($\beta 2M$) ранее описана в Claypool et al, 2002, Journal of Biological Chemistry, 277, 31, 28038-28050. В данной статье также описан рециклинг IgG этими трансфицированными клетками.

Среда для поддержания клеток во время теста включает полную среду, содержащую MEM (Gibco #21090-022), 1 × неосновные аминокислоты (Gibco 11140-035), 1 × пируват натрия (Gibco #11360-039), и L-глутамин (Gibco #25030-024).

Раствор для кислой промывки можно приготовить, используя HBSS+ (PAA #H15-008) и добавляя туда 1M MES, доводя pH до 5,9 +/- 0,5. BSA примерно 1% также может быть добавлен (Sigma # A9647). Раствор для нейтральной промывки можно приготовить, используя HBSS+ (PAA #H15-008) и добавляя туда 10M HEPES, доводя pH до 7,2 +/- 0,5. BSA примерно 1% также может быть добавлен (Sigma # A9647).

Промывка клеток с помощью кислого буфера удаляет несвязанное тестируемое антитело и несвязанный IgG и позволяет осуществлять дальнейший анализ. Кислые условия, используемые в стадии (b), способствуют связыванию IgG с FcRn и его интернализации и рециклингу.

Количество тестируемого антитела или фрагмента и IgG только на поверхности клеток может определяться с помощью промывки клеток нейтральным раствором для промывки и с помощью анализа надосадочной жидкости/смыва для детектирования количества тестируемого антитела или IgG. Важно, что лизирующий буфер не применяется. Для определения количества IgG, интернализированного клетками, антитело может быть сначала удалено с поверхности клетки с использованием нейтральной промывки, и клетки лизируют лизирующим буфером и затем анализируют внутреннее содержание. Для определения количества IgG, подвергнутого клетками рециклингу, клетки инкубируют при нейтральных условиях в течение соответствующего периода времени и буферную среду анализируют на предмет содержания IgG. Если необходимо поверхностное и внутреннее содержание антител клетки, то клетка может быть промыта с использованием кислой промывки для сохранения присутствия антитела на клеточной поверхности с последующим клеточным лизисом и анализом объединенного материала.

В случае, где целью является измерение как интернализованного, так и подвергнутого рециклингу IgG, образцы прогоняют в двух экземплярах и проводят тестирование интернализации и рециклинга по отдельности.

Подходящий лизирующий буфер включает 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton-X 100, на каждые 10 мл добавляли протеазные ингибиторы/фосфатные ингибиторы, как описано в инструкции производителя.

Как правило, IgG, который подвергается рециклингу, является меченым, в одном примере используется биотинилированный человеческий IgG. Затем IgG может детектироваться с применением, например, детектирующего антитела, меченого стрептавидином с sulfo-tag (такого как MSD # r32ad-5) 25 мл в количестве 0,2 мкг/мл MSD блокирующего буфера. Блокирующий буфер может содержать 500 mM Tris, pH 7,5, 1,5 M NaCl и 0,2% Tween-20 и 1,5% BSA.

Альтернативно IgG может быть предварительно помечен с помощью флуорофора или похожей метки.

В одном воплощении подходящая поверхность представляет собой пластиковый планшет или лунку, такую как 96-луночный планшет или что-то подобное, предметное стекло или мембрану. В одном примере клетки наносят в виде покрытия на поверхность с такой плотностью, которая приводит к образованию монослоя.

В одном воплощении, анализ, описанный в данном документе, не является измерением транцитоза антитела сверху вниз через мембрану в градиенте pH, например, когда кислые условия с одной стороны мембраны и нейтральные условия с обратной стороны мембраны.

В одном примере, тестируемое антитело или его фрагмент и IgG могут инкубировать с клетками в стадии (b) в течение примерно 1 ч например при нормальной температуре при кислых условиях для возможности связывания.

В одном примере, тестируемое антитело или его фрагмент могут инкубировать с клетками в стадии (b) в течение примерно 1 ч, например, при нормальной температуре при кислых условиях для возможности связывания перед добавлением IgG для рециклинга. Затем IgG для рециклинга клеткой может инкубироваться с клетками в стадии (b) в течение примерно 1 ч, например, при нормальной температуре при кислых условиях для возможности связывания.

Нейтральные условия облегчают высвобождение IgG в надосадочную жидкость.

Подразумевается, что "содержащий" в контексте настоящего описания означает "включающий".

В случае, где это технически уместно, воплощения изобретения могут быть объединены.

Воплощения описаны в данном документе, как включающие некоторые признаки/элементы. Изобретение также охватывает отдельные воплощения, состоящие или по существу состоящие из указанных признаков/элементов.

Технические ссылки, такие как патенты и заявки, включены в данный документ ссылкой.

Настоящее изобретение дополнительно описано исключительно путем иллюстрации в следующих примерах, которые ссылаются на сопроводительные чертежи, на которых

фиг. 1 демонстрирует % hIgG в трансгенных мышцах, определенный с помощью ЖХ-МС/МС;

фиг. 1a демонстрирует эффект формата 1638 IgG4P в отношении концентрации человеческого IVIg в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn;

фиг. 1b демонстрирует эффект форматов 1638 FabFv и Fab'ПЭГ в отношении концентрации человеческого IVIg в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn;

фиг. 1c демонстрирует фармакокинетику формата 1638 IgG4P в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn;

фиг. 1d демонстрирует фармакокинетику форматов 1638 FabFv и Fab'PEG в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn;

фиг. 1e эффект форматов 1638 FabFv и Fab'PEG в отношении концентрации сывороточного альбумина в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn;

фиг. 1f эффект формата 1638 IgG4P в отношении концентрации сывороточного альбумина в трансгенных мышцах, содержащих человеческий FcRn;

фиг. 2 демонстрирует репрезентативные кривые связывания CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения K_D (n=3) составили 0,2 нМ в нейтральном буфере, и 0,22 нМ в кислом буфере, соответственно;

фиг. 3 демонстрирует, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует рециклинг IgG в клоне 15 клеток MDCK II;

фиг. 4 демонстрирует, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует трансцитоз IgG в клоне 15 клеток MDCK II;

фиг. 5 демонстрирует, что CA170_1638.g49 FabFv ингибирует трансцитоз IgG в клоне 15 клеток MDCK II;

фиг. 6 демонстрирует репрезентативные кривые связывания для CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения K_D (n=3) составили 0,3 в нейтральном буфере, и 0,43 в кислом буфере, соответственно (см. табл. 2);

фиг. 7 демонстрирует последовательности CA170 1638 CDR;

фиг. 8 последовательности антител согласно настоящему изобретению;

фиг. 9a гуманизация антитела 1638.g49;

фиг. 9b гуманизация антитела 1638.g49.

Примеры

Сокращения

°C - температура, градусы по Цельсию,

ATR FTIR - затухающее общее отражение, ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием,

CH2 - константная область тяжелой цепи 2,

cIEF - капиллярное изоэлектрическое фокусирование,

DSC - дифференциальная сканирующая калориметрия,

GOF - фукозилированный безгалактозный биантенарный гликан,

H-цепь - тяжелая цепь,

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография,

IgG - иммуноглобулин G,

L-цепь - легкая цепь,

нЖХМС - наножидкостная хроматография масс-спектрометрия,

PBS - фосфатно-солевой буферный раствор,

Pi - изоэлектрическая точка,

SD - стандартное отклонение,

SEC - эксклюзионная хроматография,

ToF - время пролета,

Tпл - температура плавления,

TCEP - трис(2-карбоксивил)фосфин,

ТНР - трис(гидроксипропил)фосфин,
Tris - трис(гидроксиметил)аминометан.

Следующую иммунизацию осуществляли с целью наработки материала для В-клеточной культуры и скрининга антител.

Крысы Sprague Dawley иммунизировали с использованием трех доз мышинных фибробластов NIH3T3, ко-экспрессирующих мутантный человеческий FcRn (L320A; L321A) (Ober et al., 2001 Int. Immunol. 13, 1551-1559) и мышинный β 2М, и с использованием четвертой конечной бустерной дозы внеклеточного домена человеческого FcRn. Сыворотку отслеживали как на предмет связывания с мутантным FcRn на клетках НЕК-293, так и на предмет его способности предотвращать связывание Alexafluor 488-меченного человеческого IgG. Оба метода осуществляли с помощью проточной цитометрии. Для обнаружения связывания IgG в сыворотке использовали меченые фикоэритрином (PE) вторичные антитела, специфичные к мышинному или крысиному Fc.

В-клеточные культуры получали с использованием метода, сходного с описанным у Zubler et al. (1985). Вкратце, В-клетки с плотностью приблизительно 5000 клеток на лунку культивировали в 96-луночных культуральных планшетах с штрих-кодом, содержащих 200 мкл на лунку среды RPMI 1640 (Gibco BRL), дополненной 10% FCS (PAA laboratories ltd), 2% HEPES (Sigma Aldrich), 1% L-Глутамином (Gibco BRL), 1% раствором пенициллин/стрептомицин (Gibco BRL), 0,1% β -меркаптоэтанола (Gibco BRL), 2-5% надосадочной жидкости культуры активированных кроличьих спленоцитов и гамма-облученных клеток EL-4-B5 мышинной тимомы (5×10^4 /на лунку) в течение семи дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Присутствие FcRn-специфичных антител в надосадочной жидкости В-клеточной культуры определяли с использованием анализа связывания на основе гомогенной флуоресценции с использованием клеток НЕК-293, транзитивно трансфецированных мутантным FcRn (поверхностно-стабилизированный) в качестве источника антигена-мишени. 10 мкл надосадочной жидкости трансфецировали из 96-луночных культуральных планшетов со штрих-кодом в 384-луночные аналитические планшеты с черными стенками со штрих-кодом, содержащие 5000 трансфецированных клеток НЕК-293 на лунку, с использованием жидкостного манипулятора Matrix Platemate. Связывание обнаруживали с использованием Су-5 конъюгатов козьих антител к крысиному или к мышинному Fc γ -специфичному IgG (Jackson). Планшеты считывали на системе клеточного детектирования Applied Biosystems 8200. Из 3800 \times 96-луночных культуральных планшетов, представляющих 38 различных иммунизированных животных, идентифицировали 9800 антител, связывающих человеческий FcRn. Оценили, что это соответствовало скринингу приблизительно 2,5 миллиардов В-клеток.

После первичного скрининга положительные надосадочные жидкости консолидировали на 96-луночных мастер-планшетах со штрих-кодом с использованием автоматизированного устройства Aviso Onyx hit-picking robot, и В-клетки в культуральных планшетах, замороженных при -80°C. Мастер-планшеты затем скринировали в Biacore-анализе с целью идентификации лунок, содержащих антитела с высокой аффинностью и антитела, которые ингибировали связывание человеческого FcRn (см. ниже).

Анализ биомолекулярного взаимодействия с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) осуществляли на системе BIAcore T200 (GE Healthcare). Козьи IgG к крысиному Fc-гамма (Chemicon International Inc.) в 10 мМ NaAc, pH 5 буфер, иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством конденсации аминов до уровня захвата приблизительно 19500 единиц ответа (RU) с использованием HBS-EP+ в качестве подвижного буфера. 50 мМ Фосфата, pH 6+150 мМ NaCl использовали в качестве реакционного буфера для анализов аффинности и блокировки. Надосадочные жидкости В-клеточной культуры разводили в отношении 1 к 5 в 200 мМ Фосфата, pH 6 +150 мМ NaCl. 600-инъекцию разведенной надосадочной жидкости В-клеток со скоростью потока 5 мкл/мин использовали для захвата с помощью иммобилизованного антитела IgG к крысиному Fc. Человеческий FcRn в концентрации 100 нМ инъецировали над захваченной надосадочной жидкостью В-клеточной культуры в течение 180 с со скоростью 30 мкл/мин с последующей 360 с-диссоциацией. Человеческий IgG (Jackson ImmunoResearch) инъецировали еще в течение 60 с с диссоциацией в течение 180с со скоростью 30 мкл/мин.

Данные анализировали с использованием программы оценки T200 (версия 1.0) для определения констант аффинности (K_D) антител и определения таких констант, при которых происходила блокировка связывания IgG. В качестве альтернативного анализа также проводили скрининг надосадочных жидкостей мастер-планшетов в клеточном анализе блокировки человеческого IgG. 25 мкл надосадочной жидкости В-клеточной культуры из мастер-планшетов добавляли в 96-луночный круглодонный полипропиленовый планшет. Клетки НЕК-293, трансфецированные мутантным hFcRn (50000 клеток на лунку в 25 мкл PBS pH 6/1% FCS), затем добавляли к каждой лунке и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клетки промывали с помощью 150 мкл среды PBS. Клетки затем ресуспендировали в 50 мкл/на лунку среды PBS/FCS, содержащей человеческий IgG, меченный с помощью Alexafluor 488 или 649, в количестве 7,5 мкг/мл и инкубировали 1 ч при 4°C. Клетки затем промывали дважды с помощью 150 мкл среды и затем ресуспендировали в 35 мкл/на лунку среды PBS/FCS, содержащей 1% формальдегид в качестве фиксатора. Планшеты затем считывали на проточном цитометре FACS Canto 2.

Для того чтобы можно было извлечь гены вариабельных областей антитела из выбранных интересных лунок, осуществляли стадию обратной свертки для возможности идентифицировать антиген-специфичные В-клетки в данной лунке, которая содержит гетерогенную популяцию В-клеток. Этого можно добиться, используя метод Флуоресцентного фокусирования. Вкратце, иммуноглобулин-секретирующие В-клетки из положительной лунки смешивали со стрептавидиновыми микросферами (New England Biolabs), покрытыми биотинилированным человеческим FcRn и добавляли FITC-конъюгат козьих антител, специфичных к крысиному или к мышинному фрагменту Fc γ , в конечном разведении 1:1200 (Jackson). После статической инкубации при 37°C в течение 1 ч, антиген-специфичные В-клетки можно было идентифицировать благодаря наличию флуоресценции вокруг такой В-клетки. Эти индивидуальные В-клетки, идентифицированные с использованием микроскопа Olympus, затем отбирали с использованием микроманипулятора Eppendorf и помещали в ПЦР-пробирку. Флуоресцентные фокусы генерировали из 268 отобранных лунок. Гены вариабельных областей антитела извлекали из индивидуальных клеток с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ)-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к вариабельной области тяжелой и легкой цепи. Осуществляли два раунда ПЦР на аппарате Aviso Onyx liquid handling robot, с помощью вложенной ПЦР с включением сайтов рестрикции на 3'- и 5'-концах, что допускало клонирование вариабельных областей в мышинный γ 1 IgG (VH) или в мышиную каппа-цепь (VL) в экспрессирующих векторах млекопитающих. Парные конструкции тяжелой и легкой цепи ко-трансфецировали в клетки HEK-293 с использованием Фектина 293 (Invitrogen) и культивировали в 48-луночных планшетах в объеме 1 мл. После 5-7 дней экспрессии надосадочные жидкости собирали, и антитело подвергали дополнительному скринингу.

С помощью ПЦР успешно извлекали родственные пары тяжелой и легкой цепи из индивидуальных В-клеток из 156 из отобранных лунок. С помощью анализа ДНК-последовательности клонированных генов вариабельных областей идентифицировали ряд уникальных семейств рекомбинантного антитела. После транзитной экспрессии надосадочные жидкости детально исследовали с помощью обоих анализов блокировки человеческого IgG с помощью FACS (описан выше) и рециклинга IgG. В некоторых случаях получали и тестировали очищенный мышинный γ 1 IgG (данные помечены соответственно).

В анализе рециклинга применяли клетки MDCK II (клон, как описано в примерах 5, 6 и 7 ниже), сверхэкспрессирующие человеческий FcRn и бета 2 микроглобулин, которые высевали в количестве 25000 клеток на лунку 96-луночного планшета. Инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO $_2$. Клетки промывали с помощью HBSS+ Ca/Mg pH 7,2+1% BSA и затем инкубировали в присутствии 50 мкл варьирующихся концентраций надосадочных жидкостей после транзитной экспрессии HEK-293 или в присутствии очищенного антитела в течение 1 ч при 37°C, 5% CO $_2$. Надосадочную жидкость удаляли и добавляли к клеткам 500 нг/мл биотинилированного человеческого IgG (Jackson) в 50 мкл HBSS+ Ca/Mg pH 5,9 + 1% BSA и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO $_2$. Затем клетки промывали три раза с помощью HBSS+ Ca/Mg pH 5,9 добавляли к клеткам 100 мкл HBSS+ Ca/Mg pH 7,2 и инкубировали при 37°C, 5% CO $_2$ в течение 2 ч. Надосадочную жидкость удаляли из клеток и анализировали на суммарный IgG с использованием анализа MSD с захватывающим антителом против человеческого IgG (Jackson) и с детектирующим антителом, содержащим стрептавидин, меченный sulfo-tag (MSD). Кривую ингибирования анализировали с помощью нелинейной регрессии с определением значений IC $_{50}$.

На основе показателей данного анализа отбирали семейство антител, содержащих шесть CDR, представленных в SEQ ID NO 1-6. Антитело CA170 01638 обладало лучшей активностью и было отобрано для гуманизации.

Пример 1. Метод гуманизации.

Антитело CA170 01638 гуманизировали путем прививки CDR из V-областей крысиного антитела на каркас V-области человеческого зародышевого антитела. С целью восстановления активности антитела ряд каркасных остатков из крысиных V-областей также сохраняли в гуманизированной последовательности. Эти остатки отбирали с использованием протокола, изложенного в Adair et al. (1991) (Humanised antibodies WO91/09967). Сравнение последовательностей V-области крысиного антитела (донорного) с последовательностями V-области человеческого зародышевого антитела (акцепторного) представлено на фиг. 9A и B, вместе с сконструированными гуманизированными последовательностями. CDR, привитые из донорной на акцепторную последовательность, такие, как определено у Kabat (Kabat et al., 1987), за исключением CDR-H1, где использовали объединенное определение Chothia/Kabat (см. Adair et al., 1991 Humanised antibodies. WO91/09967). Человеческую V-область IGRV1-27 вместе с J-областью JR4 (<http://www.imgt.org/>) выбирали в качестве акцептора для CDR легкой цепи. Человеческую V-область IGHV3-7 вместе с J-областью JR3 (<http://www.imgt.org/>) выбирали в качестве акцептора для CDR тяжелой цепи.

Гены, кодирующие ряд вариантов последовательностей V-областей тяжелой и легкой цепи разрабатывали и конструировали с помощью способа автоматического синтеза Entelechon GmbH. Дополнительные варианты V-областей как тяжелой, так и легкой цепи создавали путем модификации генов VH и VR с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Эти гены клонировали в ряд векторов для экспрессии гуманизованного антитела 1638 Fab или IgG4 в E.coli и в клетках млекопитающих, соответственно. Варианты цепей и их комбинации оценивали на предмет их эффективности по отношению к ро-

дательскому антителу, их биофизических свойств и пригодности для дальнейших процессов, что привело к отбору привитой легкой цепи gL7 и привитой тяжелой цепи gH33. Конечные привитые последовательности gL7 и gH33 представлены на фиг. 9А и В, соответственно. Данное объединение V-областей получило название 1638.g49.

Каркасные остатки легкой цепи в привитом компоненте gL7 все взяты из человеческого зародышевого гена, за исключением остатков 70 и 71 (нумерация Kabat), где донорные остатки гистидина (H70) и тирозина (T71), соответственно, сохранены. Сохранение этих двух остатков важно для полноценной эффективности гуманизированного антитела или Fab. Остаток 56 в CDRL2 привитого компонента gL7 подвергали мутации, превращая из аспарагиновой кислоты (D56) в остаток глутаминовой кислоты (E56), удаляя таким образом потенциальный сайт изомеризации аспарагиновой кислоты из последовательности gL7. Каркасные остатки тяжелой цепи в привитом компоненте gH33 все взяты из человеческого зародышевого гена, за исключением остатков 48 и 78 (нумерация Kabat), где донорные остатки лизина (L48) и аланина (A78), соответственно, сохранены. Сохранение этих двух остатков существенно для полноценной эффективности гуманизированного антитела или Fab.

Для экспрессии 1638.g49 Fab в E.coli гены V-областей гуманизированной тяжелой и легкой цепи клонировали в UCB-экспрессирующий вектор pTOD, который содержит ДНК, кодирующую человеческую константную область С-каппа (K1m3 аллотип) и СH1-область человеческого антитела гамма-1 (вместе или без шарнирной области) (Glm17 аллотип).

Для экспрессии 1638.g49 IgG4 в клетках млекопитающих, ген V-области гуманизированной легкой цепи соединяли с ДНК-последовательностью, кодирующей константную область человеческой С-каппа (K1m3 аллотип), для создания непрерывного гена легкой цепи. Ген V-области гуманизированной тяжелой цепи соединяли с ДНК-последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи человеческого антитела гамма-4 вместе с шарниром, стабилизирующим мутацию S241P (Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1):105-8), для создания непрерывного гена тяжелой цепи. Гены тяжелой и легкой цепи клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих.

Другой более ранний привитой компонент 1638.g28 использовали в примере 8А, описанном в данном документе ниже, и он содержит больше донорных остатков в тяжелой цепи (gH2), чем привитой компонент 1638.g49 (F24, L48, K71, T73, A78 и V93). Также легкая цепь данного антитела (gL2) содержит немодифицированную CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 5, в отличие от модифицированной CDRL2 из SEQ ID NO: 7, которую использовали в 1638.g49. Последовательность обоих вариантов антител представлена на фиг. 8. Антитело 1638.g28 экспрессировали как Fab'-фрагмент, как описано выше для 1638.g49.

Пример 2. Получение конъюгата 1638.g49 Fab'-ПЭГ.

Fab', экспрессированный в периплазматическое пространство E.coli, экстрагировали из клеток путем тепловой экстракции. Fab' очищали с помощью Протеин G-аффинной очистки с использованием кислотной элюции. Fab' восстанавливали и пэгиллировали с использованием 40 кДа ПЭГ (SUNBRIGHT GL2-400MA3). ПЭГ ковалентно связан посредством малеимидной группы с одной или несколькими тиольными группами фрагмента антитела. Эффективность пэгиллирования подтверждали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Fab'-ПЭГ отделяли от непэгиллированного Fab' и diFab' с помощью катионообменной хроматографии. Фракции анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и SDS-PAGE. Объединение проводили для минимизации уровня примесей. Конечный образец концентрировали и подвергали диалфильтрации в целевом буфере.

Пример 3. Аффинность для связывания hFcRn.

Анализ биомолекулярного взаимодействия с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) осуществляли на системе BIAcore T200 (GE Healthcare) и определяли связывание с внеклеточным доменом человеческого FcRn. Внеклеточный домен человеческого FcRn получали в виде нековалентного комплекса между внеклеточным доменом альфа-цепи человеческого (SEQ ID NO: 48) и β 2-микроглобулином (β 2M) (SEQ ID NO: 72). Affinipure, F(ab')₂ фрагмент козьего IgG, специфичный к человеческому Fc-фрагменту (для захвата IgG4) (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc.) в количестве 50 мкг/мл в 10 mM NaAc, буфер pH 5, иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством конденсации аминов до уровня захвата 5000-6000 единиц ответа (RU) с использованием HBS-EP⁺ (GE Healthcare) в качестве подвижного буфера.

50 mM фосфат, pH 6 + 150 mM NaCl + 0,05% P20 или HBS-P+, pH 7,4 (GE Healthcare) использовали в качестве подвижного буфера для анализа аффинности. Антитело 1638.g49 IgG4P разводили до 1 мкг/мл в подвижном буфере. 60с-инъекцию IgG4 со скоростью потока 10 мкл/мин использовали для захвата иммобилизованным антителом к Fc-фрагменту человеческого IgG. Внеклеточный домен человеческого FcRn титровали от 20 нМ до 1,25 нМ над захваченным антителом к FcRn (IgG4) в течение 300с со скоростью 30 мкл/мин с последующей 120с диссоциацией. Поверхность регенерировали с помощью обработки 2×60 с 50 mM HCl со скоростью потока 10 мкл/мин для подвижного буфера при pH 6 или с помощью обработок 60 с 40 mM HCl и 30с 10 mM NaOH для подвижного буфера при pH 7,4. Данные анализировали с использованием расчетной программы программного обеспечения T200 (версия 1.0) с использованием модели связывания 1:1 с локальным Rmax.

Таблица 1. Данные аффинности для антитела 1638.g49 IgG4P к hFcRn при pH6 и pH 7.4

pH 6		Человеческий FcRn		
1638.g49 IgG4P	ka (M ⁻¹ V ¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)	
1	1,10E+06	1,43E-04	1,29E-10	
2	1,10E+06	1,39E-04	1,26E-10	
3	1,11E+06	1,40E-04	1,27E-10	
Среднее	1,10E+06	1,41E-04	1,27E-10	

pH 7,4		Человеческий FcRn		
1638.g49 IgG4P	ka (M ⁻¹ V ¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)	
1	9,75E+05	2,51E-05	2,57E-11	
2	9,62E+05	3,19E-05	3,32E-11	
3	9,62E+05	2,82E-05	2,93E-11	
Среднее	9,67E+05	2,84E-05	2,94E-11	

Таким образом определили, что аффинность 1638.49g IgG4 составляет 127 пМ при pH 6 и 29 пМ при pH 7,4.

Пример 4. Анализировали полноразмерную молекулу IgG4P и молекулу Fab-dsFv, где варибельная область 1638.g49 была включена в Fab-домен каждого формата, на предмет биохимической целостности и биофизической стабильности.

Методы и Результаты.

1. Подтверждение последовательности.

i) Секвенирование белка (химический метод Эдмана).

N-концевую аминокислотную последовательность обоих образцов, IgG4 и Fab-dsFv, получали с использованием прибора Applied Biosystems Procise 494. Он функционирует как рекомендовано инструкциями производителя. Приблизительно 100 пмоль каждого образца наносили на диски поливинилидендифторида (Prosorb, использовали согласно рекомендациям производителя) и подвергали 18 циклам, которые включали два пустых прогона и стандартный, что приводило к анализу первых 15 аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепей. Анализ осуществляли с использованием программного обеспечения SequencePro Data Analysis Application V2.0.

Для каждого образца наблюдаемая последовательность представляла собой смесь из двух приблизительно равно представленных последовательностей, EVQLVESGGGLVQPG (SEQ ID NO: 67) и DIQMTQSPSSLSASV (SEQ ID NO: 68), согласующихся с N-концевыми последовательностями, ожидаемыми от последовательностей генов тяжелой и легкой цепи, соответственно. Приблизительно равная представленность предполагала равные молярные количества 2 цепей с небольшой или с незначительной N-концевой блокадой.

ii) Масс-спектрометрический анализ.

а) Анализ интактной массы.

Масс-спектрометрический анализ интактных молекул осуществляли на двух партиях молекул IgG4 и Fab-dsFv после восстановления с помощью 20 mM TCEP в течение одного часа. Массы измеряли на масс-спектрометре Agilent 6510, оборудованном модулем для ВЭЖХ-чипов (chip cube) и чипом C8 (43 мм Zorbax 300A C8 колонка + 43 нл ловушка). Все образцы разводили до 0,1 мг/мл в смеси 98% вода/2% метанол/0,3% муравьиная кислота (растворитель А) перед инъекцией и загружали в систему 0,3 мкл. Белки элюировали из чипа в масс-спектрометр с использованием градиента до 40% ацетонитрила/0,1% муравьиной кислоты со скоростью потока 350 нл/мин. Данные ToF-MS собирали в режиме определения положительных ионов от 500 до 5000 m/z и процессировали с использованием программного обеспечения Agilent MassHunter.

Наблюдаемые массы для обеих цепей, легкой и тяжелой, для обоих форматов представлены ниже (табл. 2).

Таблица 2. Таблица наблюдаемой массы двух партий IgG4 и Fab-dsFv

	L-цепь			H-цепь		
	Ожидаемая ¹	Наблюдаемая	м. д.	Ожидаемая ¹	Наблюдаемая	м. д.
IgG4 Партия#1	23503,3	23505,8	106	50764,7	50768,9	83
IgG4 Партия#2		23505,7	102		50768,9	83
FabFv	36384,4	[L1] 36385,4	27	38298,8	[H1] 38301,1	60
		[L2] 36387,6	88		[H2] 38302,6	99

Ожидаемая масса, рассчитанная на основе аминокислотной последовательности с добавлением IgG4: 2 L- и 4 H- дисульфида взаимодействия, GOF-гликозилирование и клиппирование C-концевого Lys из N-цепи FabFv: 3 L- и 3 H- дисульфида взаимодействия.

Анализ интактной массы IgG4, восстановленного с помощью TCEP, согласовывался с ожидаемыми последовательностями с преимущественным GOF-гликозилированием и клиппированным C-концевым лизином (приблизительно 90%) на N-цепи, что типично для рекомбинантного IgG.

Аналогично, масс-спектр интактных цепей Fab-dsFv согласовывался с массой последовательности и ожидаемым количеством дисульфидов. Присутствовала гетерогенность в наблюдаемой массе обеих цепей благодаря частичному восстановлению внутрицепных дисульфидов с помощью TCEP.

b) Картирование дисульфидов осуществляли только на IgG4.

IgG4 (50 мкг) обрабатывали с помощью 0,15% Rapigest в Tris-HCl pH 7,5 при 50°C в течение 15 мин, и любые свободные цистеины алкилировали с помощью иодоацетамида. Добавляли трипсин (1:25 мас./мас.) и гидролизывали белок в течение ночи при комнатной температуре и затем реакцию гасили путем добавления муравьиной кислоты (5% об./об.), и удаляли любой осадок центрифугированием. Образцы хранили при -20°C и разводили 1:1 водой перед загрузкой в систему ЖХ-МС. Аликвоты (~3-5 мкг) загружали на колонку C18 2,1×150 мм (Waters BEH1.7u), уравновешенную водой, содержащей 0,2% муравьиную кислоту, и элюировали с использованием градиента ацетонитрила/1-пропанола в масс-спектрометр Waters Xevo, функционирующий в режиме определения положительных ионов MS^E. Данные анализировали с использованием программного обеспечения MassLynx и BioRN arnaLynx.

Результаты выявили, что наблюдались все ожидаемые дисульфид-связанные пептиды за исключением образцов с пептида T19-SS-T19 с междоцепной связью H-H, которую наблюдали только для единственной дисульфидной связи и с низкой интенсивностью. Не было никаких указаний на присутствие образцов с беспорядочными дисульфидными связями или с карбамидометилированными остатками цистеина.

2. Биохимический анализ.

Эксклюзионная хроматография ВЭЖХ (SEC HPLC).

Эксклюзионная хроматография позволяла анализировать мономерный и олигомерный материал. Ее осуществляли с использованием TSK G3000SW (7,7 мм I.D × 30 см L) колонки, связанной с системой Agilent 1100. Образцы (инъекция 25 мкл/25 мкг) элюировали изократически в 0,2 М фосфате натрия, pH 7 со скоростью потока 1 мл/мин в течение 30 минут, 30°C. Элюирование отслеживали с помощью поглощения при 280 нм.

Профили элюирования продемонстрировали, что IgG4 и Fab-dsFv являются гомогенными и элюируются с ожидаемым временем удержания исходя из стандартов SEC (BioRad 151-1901).

3. Молекулярный заряд.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF) проводили для оценки pI и содержания кислых частиц.

Образцы IgG4 и Fab-dsFv разводили до 1 мг/мл в воде класса.

ВЭЖХ для анализа (не восстановительные условия). Образцы также подвергали восстановлению (2 mM TBP/30 мин) и алкилированию (20 mM иодоацетамид/80 мин) для анализа на предмет аддуктов цистеина.

Образцы готовили с помощью смешивания следующих ингредиентов: 30 мкл образца белка, 0,35% метилцеллюлозы, 4% амфолиты pH 3-10 (PH armalyte), 1 мкл каждого синтетического pI-маркера (4,65 и 9,77) и воды класса ВЭЖХ с получением конечного объема 100 мкл. Затем смесь анализировали с использованием анализатора iCE280 IEF (Convergent Biosciences), осуществляли пре-фокусирование при 1500В в течение 1 мин с последующим фокусированием при 3000В в течение 6 минут. Калиброванные электроферограммы затем интегрировали с использованием программного обеспечения Empower (от Waters).

pI принимали такое значение, как у большинства частиц (наибольший пик).

Для формата IgG4 большинство частиц имело pI 7,3. Предположили, что это является клиппированной родительской молекулой (удаление C-концевого лизина, подтвержденное масс-спектрометрическим анализом), что не является нетипичным для молекул IgG. Клиппированная молекула была бы более кислой, чем родительская молекула (основной пик при 7,4). Отсутствовали изменения профиля до и после восстановления и алкилирования, указывая на отсутствие аддуктов цистеина.

Для формата Fab-dsFv, за pI принимали такое значение, как у большинства частиц (наибольший пик), которое составило 9. Также были заметны более кислые частицы (pI 8,8), которые были менее заметны после восстановления/алкилирования, указывая на присутствие способного восстанавливаться аддукта.

Для обоих форматов присутствовали минорные пики, будучи либо кислыми (слева от основного пика) или основными (справа от основного пика). Полагали, что эти частицы являются производными основных частиц, но их дополнительно не охарактеризовывали.

4. Термостабильность (T_{пл}).

При нагревании белок будет иметь тенденцию к разворачиванию, и наиболее стабильно свернутая

белковая структура это такая, для которой требуется более сильное нагревание, чтобы ее развернуть. Таким образом, термостабильность (измеренная в виде температуры плавления, $T_{пл}$) представляет собой меру стабильности сворачивания белка или устойчивость молекулы к разворачиванию (денатурации), что может быть предпосылкой к образованию агрегатов. В температурном градиенте в определенных условиях температура, при которой 50% молекул разворачиваются, представляет собой $T_{пл}$. Оценки $T_{пл}$ проводили двумя независимыми методами

i) анализ ThermoFluor, измерение 50% разворачивания с помощью связывания флуоресцентного красителя (Sypro Orange) с экспонированными гидрофобными поверхностями, которые становятся экспонированными при разворачивании структуры, вызванном нагреванием, и

ii) дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC).

Результаты этих двух методов, как правило, коррелируют, слабо различаясь в абсолютных значениях, что связано с различиями применяемых методов.

i) Анализ ThermoFluor.

Образцы готовили следующим образом: 5 мкл 30× sypro orange помещали в 96 луночный V-донный планшет. Затем добавляли 45 мкл образца белка в количестве 0,1 мг/мл. Смесь наносили пипеткой по 10 мкл в четырех экземплярах в 384-луночный планшет. Формат 384-луночного планшета: образец 1: лунки A1, B1, A2, B2; образец 2: лунки C1, D1, C2, D2. Внутренний контроль представляет собой чужеродный IgG4. Данный контроль добавляли в количестве 0,1 мг/мл (в PBS pH 7,4) к 5 мкл 30× концентрированного красителя, 10 мкл данного мастер-микса помещали в 384-луночный планшет в четырех экземплярах. Планшеты помещали в систему быстрого ПЦР в реальном времени 7900 HT и нагревали от 20 до 99°C с использованием скорости изменения 1,1°C/мин; устройство CCD одновременно отслеживает изменения флуоресценции в лунках. Модифицированную матрицу XE (IDBS) использовали для обработки данных интенсивности и принимали во внимание множество конформационных переходов.

Два конформационных перехода с уничтожением складок были обнаружены для обеих молекул, IgG4 и Fab-dsFv. Значение $T_{пл2}$ для обеих молекул характеризовало разворачивание Fab-домена и, как показано, было чуть ниже для формата IgG4. Значение $T_{пл1}$ характеризовало домен CH2 (константный домен тяжелой цепи) и домен dsFv IgG4 и молекулы Fab-dsFv, соответственно. Было показано, что формат Fab-dsFv является более термостабильным, чем формат IgG в PBS, pH 7,4.

Образец	Значение $T_{пл1}$ (°C)	$T_{пл1}$ SD	Значение $T_{пл2}$ (°C)	$T_{пл2}$ SD
IgG4	65,4	0,1	81,1	0,4
Fab-dsFv	73,6	0,4	83,1	0,4

ii) Метод DSC.

Анализ DSC осуществляли только на молекуле Fab-dsFv для подтверждения данных анализа ThermoFluor и для определения эффекта двух различных типов буфера (PBS pH 7,4 и 50 mM ацетат натрия/125 mM хлорид натрия, pH 5) в отношении термостабильности. Образцы в количестве 1 мг/мл в PBS pH 7,4 и 50 mM ацетат натрия/125 mM хлорид натрия, pH 5 с соответствующими эталонными буферами загружали на прибор MicroCal VP Capillary DSC в трех экземплярах. Настройки системы включали температурное сканирование от 20°C до 110°C, и скорость сканирования 60°C/ч. Конечные термограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Origin согласно инструкциям производителя. $T_{пл}$ определяли с использованием автоматизированного программного алгоритма детектирования $T_{пл}$ (для основного конформационного перехода) и вручную выбирали пик для любых других конформационных переходов, которые не детектировались автоматически программой.

Можно было наблюдать два отдельных конформационных перехода в двух тестируемых буферах.

Более низкий конформационный переход ($T_{пл1}$) характеризовал домен dsFv молекулы Fab-dsFv, а более высокая температура перехода ($T_{пл2}$) характеризовала Fab-домен.

Данные DSC хорошо согласовывались с данными, полученными из анализа ThermoFluor. Данный метод был способен различать два развернутых домена легче, чем анализ ThermoFluor.

Молекула Fab-dsFv продемонстрировала небольшое увеличение термостабильности в буфере 50 mM ацетат натрия/125 mM хлорид натрия, pH 5.

Буфер	Значение $T_{пл1}$ (°C)	SD	Значение $T_{пл2}$ (°C)	SD
Fab-dsFv (50 mM NaOAc/125 mM NaCl, pH 5)	86,1	0	73,6	0,15
Fab-dsFv (PBS, pH 7,4)	84,1	0,1	71,2	0,06

5. Молекулярная структура: Ослабленная Полная Спектроскопия Инфракрасного Преобразования Фурье Отражения (ATR FTIR).

Этот способ использовали для сравнения степени взаимодействия между β -листами в пределах молекулы (интра- β -лист) и между отдельными молекулами (интер- β -лист).

Анализ осуществляли с помощью спектрометра Bruker Tensor 27 FTIR и устройства для сбора образцов из ячейки BIOATRII при разрешении 4 см^{-1} ; 120 сканов; установка диафрагмы 6 мм и 20 мкл объем образца при 20°C , где осуществляли следующие процедуры для анализа только Fab-dsFv.

1. Измеряли пять фоновых спектров воздуха методом BIOATR 10 06 10. xpm.
2. 20 мкл сигма PBS pH 7,4 добавляли в ячейку, а затем удаляли.
3. 20 мкл сигма PBS pH 7,4 добавляли в ячейку и снимали спектр, буфер удаляли и свежий буфер добавляли и снимали спектр (дважды).
4. 20 мкл образца добавляли в ячейку и снимали спектр, образец затем удаляли из ячейки.
5. 20 мкл сигма PBS pH 7,4 добавляли в ячейку, а затем удаляли.
6. 20 мкл образца добавляли в ячейку и снимали спектр, образец затем удаляли из ячейки, (дважды)
7. Затем ячейку очищали процедурой, представленной ниже:
 - a. 20 мкл 1% SDS добавляли в ячейку + очищали с помощью Q-tip
 - b. 20 мкл 1% SDS добавляли в ячейку и удаляли
 - c. 5 раз добавляли 20 мкл H_2O в ячейку и удаляли
 - d. 20 мкл буфера добавляли в ячейку и удаляли
8. Данные анализировали для получения конечного формата данных следующим образом.
 - a. 1 спектр буфера удаляли из 1 спектра Fab-dsFv и затем повторяли со 2 спектром буфера и 2 спектром Fab-ds Fv.
 - b. Данные вырезали с 2200 см^{-1} по 1000 см^{-1}
 - c. Дублированные спектры усредняли.
 - d. Вторую производную брали со сглаживанием по 25 точкам. Это был показан окончательный формат данных.

Результаты анализа показали, что Fab-dsFv имел характеристики интра-бета-листа, что типично для молекул антитела.

Пример 5. Клеточный анализ эффективности.

Клеточные анализы эффективности проводили на клетках Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) II, которые были стабильно трансфицированы вектором с двумя генами, человеческим FcRn и человеческим $\beta 2\text{M}$, с последующей селекцией на маркере генетицине. Стабильный клеточный клон выбирали так, чтобы он был способен к рециклингу и подвергать трансцитозу человеческие IgG, и его использовали для всех дальнейших исследований. Его назвали MDCK II клон 15.

Клеточная аффинность CA170_1638.g49 IgG4 для человеческого FcRn.

Количественные эксперименты проточной цитометрии проводили с помощью клеток MDCK II клон 15 и AlexaFluor 488-меченных CA170_1638.g49 IgG4. Специфическое связывание антитела с FcRn по всему диапазону концентраций антител использовали для определения Kd. Анализы осуществляли как в нейтральном, так и в кислом буферах для определения возможного влияния, которое оказывает pH окружающей среды в плазме крови (pH 7,4) или эндосомах (pH 6) на связывание с антителом. На фиг. 2 показаны репрезентативные кривые связывания для CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения K_D (n=3) были равны 0,2 в нейтральном буфере, и 0,22 в кислом буфере, соответственно (см. табл. 4).

Таблица 4. Средние значения K_D (нМ) для CA170_1638.g49 IgG4 на клетках MDCK II клон 15.

Формат антитела	Человеческий	Человеческий
	FcRnpH 7.4	FcRnpH 6
I638.g49 IgG4	0,20	0,22

Фиг. 2 демонстрирует CA170_1638.g49 IgG4 связывание клеток MDCK II клон 15 при кислом и нейтральном pH.

Клетки MDCK II клон 15 инкубировали в буфере для FACS (PBS с 0,2% мас./об. BSA, 0,09% мас./об. NaN_3) в течение 30 минут перед добавлением Alexa-fluor 488-меченного CA170_1638.g49 IgG4 в течение 1 часа в буфере для FACS либо при pH 7,4, либо pH 6. Концентрации конечного антитела в диапазоне от 400 нМ до 0,003 нМ. Клетки отмывали в ледяном буфере для FACS, затем анализировали проточной цитометрией с помощью проточного цитометра Guava (Millipore, Великобритания). Наборы данных титрования также были получены для изотипических контрольных антител для каждого формата антитела для определения неспецифического связывания. Количество молей связанного антитела было рассчитано с помощью интерполированных значений из стандартной кривой, полученной из гранул, содержащих различные количества флуоресцентного красителя. Значения геометрического среднего флуоресценции определяли в при проточном цитометрическом анализе клеток и гранул. Неспецифическое связывание вычитали из значений антитела к FcRn, а специфическое связывание определяли из кривой, полученной анализом нелинейной регрессии с помощью уравнения связывания в одном участке (Graph Pad Prism®) для определения K_D . Данные являются репрезентативными 3 экспериментов. CA170_1638.g49 IgG4 могут связывать человеческий FcRn, экспрессированный на клетках как при кислом, так и нейтральном pH.

Пример 6. Функциональные клеточные тесты.

Экспрессия FcRn является первичной внутриклеточной (Borvak J et al. 1998, *Int. Immunol.*, 10 (9) 1289-98 и Cauza K et al. 2005, *J. Invest. Dermatol.*, 124 (1), 132-139), и ассоциирована с эндосомными и лизосомными мембранами. Fc-часть IgG связывается с FcRn при кислом pH (<6,5), но не при нейтральном физиологическом pH (7,4) (Rhagavan M et al. 1995), и эта pH-зависимость облегчает рециклинг IgG.

Сразу после поглощения пиноцитозом и попадания в кислую эндосому, IgG, связанный с FcRn, будет подвергнуто рециклингу вместе с FcRn на клеточную поверхность, тогда как при физиологически нейтральном pH IgG будет высвобождено. (Ober RJ et al. 2004, *The Journal of Immunology*, 172, 2021-2029). Любое IgG, не связанное с FcRn, будет переходить к деградации в лизосоме.

Для проверки способности CA170_1638.g49 IgG4 ингибировать способность FcRn к рециклингу IgG, был разработан *in vitro* анализ. Вкратце, клетки MDCK II клон 15 инкубировали с биотинилированными человеческими IgG в присутствии или в отсутствии 1638 IgG4 в кислом буфере (pH 5,9) для того, чтобы позволить связаться с FcRn. Все избыточные антитела удаляли, и клетки инкубировали в буфере с нейтральным pH (pH 7,2), который позволяет высвободить экспонированный на поверхность, связанный и интернализированный IgG в надосадочной жидкости. Ингибирование FcRn исследовали с помощью анализа MSD для детекции количества подвергнутого рециклингу IgG, и, таким образом, высвобожденного в надосадочную жидкость.

Фиг. 3 демонстрирует, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует рециклинг IgG в клоне 15 клеток MDCK II. Клетки MDCK II клон 15 рассеивали по 15000 клеток на лунку в 96-луночной планшете и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Клетки инкубировали с 1 мкг/мл биотинилированных человеческих IgG (Jackson) в присутствии или отсутствии CA170_1638.g49 IgG4 в HBSS⁺ (Ca/Мд) pH 5,9+1% BSA в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂. Клетки промывали HBSS⁺ pH 5, 9 затем инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 2 часов в HBSS pH 7,2. Надосадочную жидкость удаляли из клеток и анализировали на общие IgG с помощью анализа MSD (с использованием захватывающего антитела против человеческого IgG (Jackson) и проявляющего антитело с помощью стрептавидина, меченного sulfo-tag (MSD)). Кривую ингибирования анализировали нелинейной регрессией (Graph pad Prism®) для определения EC₅₀. График представляет объединенные данные из 3 экспериментов. Как показано на фиг. 3 CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует рециклинг IgG зависимым от концентрации образом со средним значением EC₅₀ (n=3), равным 0,31 нМ.

CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv ингибируют транцитоз человеческого IgG.

FcRn может перемещать IgG через слои поляризованных эпителиальных клеток как в апикально-базолатеральном направлении, так и базолатерально-апикальном направлении, и таким образом, играет важную роль в обеспечении перемещения IgG между кровотоком и люменом через слизистые барьеры (Claypool et al. 2004 *Mol Biol Cell* 15(4):1746-59).

FcRn может перемещать IgG через слои поляризованных эпителиальных клеток как в апикально-базолатеральном направлении, так и базолатерально-апикальном направлении, и таким образом, играет важную роль в обеспечении перемещения IgG между кровотоком и люменом через слизистые барьеры (Claypool et al. 2004 *Mol Biol Cell* 15(4):1746-59).

Анализ *in vitro* был разработан для определения способности CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv ингибировать FcRn-зависимый транцитоз IgG. Вкратце, клетки MDCK II клон 15 рассеивали в 24 луночной планшете Transwell и позволяли им образовать монослои в течение 3 дней. Клетки инкубировали с биотинилированным человеческим IgG в кислом буфере, который облегчают связывание с FcRn, на апикальной стороне в присутствии и отсутствии CA170_1638.g49 IgG4 или FabFv. Человеческие IgG подвергались транцитозу через клетки с апикальной к базолатеральной стороне и высвобождались в нижнюю камеру. Уровни IgG на базолатеральной стороне затем измеряли с помощью анализа MSD.

Фиг. 4 и 5 демонстрируют, что CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv ингибируют апикально-базолатеральный транцитоз IgG в клетках MDCK II клон 15. Клетки MDCK II клон 15 рассеивали по 500000 клеток на лунку в 24 луночной планшете Transwell и инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂ до образования монослоя. pH апикального компартмента корректировали до 5,9, а базолатеральной стороны до 7,2 в буфере HBSS⁺ (Ca/Mg) +1% BSA. Клетки на апикальном компартменте инкубировали с 1 мкг/мл биотинилированного человеческого IgG (Jackson) в присутствии и отсутствии CA170_1638.g49 IgG4 или FabFv в указанных концентрациях в течение 4 часов при 37°C, 5% CO₂. Базолатеральную среду затем собирали и общее количество IgG измеряли анализом MSD (с использованием захватывающего антитела против человеческого IgG (Jackson) и проявляющего антитело с стрептавидином, меченным sulfo-tag (MSD)). Кривую ингибирования анализировали нелинейной регрессией (Graph pad Prism®) для определения EC₅₀. График представляет объединенные данные из 3 экспериментов.

Таким образом, фиг. 4 и 5 демонстрируют, что CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv могут ингибировать апикально-базолатеральный транцитоз человеческих IgG зависимым от концентрации способом со значением EC₅₀ равным 2,4 и 0,42 нМ, соответственно (n=3).

Сводка *in vitro* эффектов CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv ингибируют как рециклинг, так и транцитоз IgG. EC₅₀, равное 0,31 нМ, полученное в анализе рециклинга IgG, сравнимо с данными аффинного связывания клеток, в котором были получены значения K_D, равное 0,2 нМ в

нейтральном буфере и 0,22 нМ в кислом буфере. В анализе транцитоза IgG EC₅₀, равное 2,4 нМ и 0,42 нМ получали для CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv соответственно, демонстрируя слабое снижение эффективности между IgG4 и FabFv. Однако данные в этом разделе ясно показали, что CA170_1638.g49 IgG4 и FabFv могут ингибировать функцию человеческого FcRn.

Пример 7. Перекрестная реактивность CA170_1638.g49 IgG4 FcRn низших приматов.

Для проверки применения CA170_1638.g49 IgG4 в исследовании PK/PD низших приматов и пре-клинической токсикологии, изучали его относительную аффинность с FcRn яванского макака. Клетки MDCK II стабильно трансфецировали FcRn и β2M яванского макака (MDCKII (клон 40) использовали в клеточном анализе, вместе с ранее описанными клетками MDCK II, стабильно трансфецированными человеческим FcRn и β2M (MDCK II клон 15).

Фиг. 6 демонстрирует CA170_1638.g49 IgG4 IgG4 связывание клеток MDCK II клона 15 при кислом и нейтральном pH. Специфическое связывание антитела с FcRn в диапазоне концентраций антител использовали для определения K_D. Анализ осуществляли как в нейтральном, так и кислом буферах для определения возможного влияния, которое оказывает pH окружающей среды в плазме крови (pH 7,4) или эндосомах (pH 6) на связывание с антителом.

Фиг. 6 демонстрирует репрезентативные кривые связывания для CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения K_D (n=3) составляли 0,3 в нейтральном буфере и 0,43 в кислом буфере, соответственно.

Таблица 5. Средние значения K_D (нМ) для CA170_1638.g49 IgG4 на клетках MDCK II клон 40

Формат антитела	Сyno FcRnpH 7,4	Сyno FcRnpH 6
1638 IgG4	0,3	0,43

Пример 8А. Обработка антителом FcRn облегчает очистку hIgG in vivo в трансгенных мышах hFcRn.

Эффект молекул антител к FcRn (CA170_01519.g57 Fab'-ПЭГ (описанных в WO2014/019727) и CA170_01638.g28 Fab'-ПЭГ) на выведение человеческого IVIG определяли на трансгенных мышах с человеческим FcRn (B6.Cg-Fcgrt^{tmlDcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ, JAX Mice). Мышей инфузирвали внутривенно 500 мг/кг человеческого IgG (Человеческий IgI 10% Gamunex-c, Talecris Biotherapeutics). Через 24 ч животным вводили дозу контроля-носителя (PBS) или антитела к FcRn в виде одиночной дозы внутривенно (100 мг/кг). Образцы были серийными образцами крови из кончика хвоста, которые забирали в моменты времени -24, 8, 24, 48, 72, 96, 144 и 192 ч относительно обработки антителом к FcRn. Сывороточные уровни человеческого IgG в мышах hFcRn определяли с помощью ЖХ-МС/МС. Данные, представленные на фиг. 1, являются средними ± SEM с 5-6 мышами на группу обработки. Блокировка hFcRn каждой из протестированных молекул антител к FcRn приводит к усиленному выведению hIVIG, а также наблюдали пониженные концентрации общего IgG по сравнению с контрольными мышами.

Пример 8В. Обработка антителом к FcRn облегчает очистку hIgG in vivo в трансгенных мышах hFcRn.

Обнаруженное антитело к человеческому FcRn связывается с FcRn и ингибирует связывание человеческого IgG с человеческим FcRn, но не связывает или ингибирует мышинный FcRn. Следовательно, эффект молекул антитела к FcRn в формате IgG4P (1638.g49), формате Fab'-ПЭГ (1638.g28), и формате FabFv в отношении выведения человеческого IVIg определяли на трансгенных мышах с человеческим FcRn (мыши B6.Cg-FcgrttmlDcr Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ, JAX). Мышей инфузирвали внутривенно 500 мг/кг человеческого IgG (Человеческий IgI 10% Gamunex-c, Talecris Biotherapeutics). Через 24 часа животным внутривенно вводили дозу контроля носителя (PBS) или антитела к FcRn в виде одиночной дозы. Дозы, периоды отбора образцов и количества повторов были такими же, как указанные на фиг. 1a-1e. Образцы были серийными образцами крови из кончика хвоста. Уровни в сыворотке человеческого IgG, эндогенного мышинного альбумина и самой молекулы антитела к FcRn определяли с помощью ЖХ-МС/МС, с детекцией и количественным определением пептидных последовательностей, уникальных к каждому из этих аналитов. Данные, представленные на фиг. 1a-1e, являются геометрическим средним и 95% доверительным интервалом.

Блокада hFcRn каждой из трех протестированных молекул антитела к FcRn приводили к выведению hIVig, который был усилен по сравнению с выведением в контрольных мышах, которые были обработаны только носителем, или с контрольным Fab'-ПЭГ (A33, не антитело к FcRn, конъюгированное с 40 кДа ПЭГ, каким являлся 1638 Fab'-ПЭГ) - см. фиг. 1a и 1b. Эффект был дозозависимым -большие дозы давали более продолжительные периоды, в ходе которых в сыворотке детектировали антитела к FcRn (фиг. 1c и 1d), это приводит к более пролонгированному и более полному выведению человеческих IVIg из мышей. 1638 Fab'-ПЭГ демонстрировали краткосрочную фармакокинетику (более быстрое исчезновение из свободного раствора в сыворотке), чем контрольные A33 Fab'-ПЭГ, подтверждающую, что 1638 Fab'-ПЭГ подвергаются опосредованному мишенью расположению - исчезают из свободного раствора при связывании с FcRn-мишенью. Хотя мышинные IgG не связываются с человеческим FcRn, присутствующим в этих трансгенных мышах, эндогенный мышинный альбумин связывался и подвергался рециклингу человеческого FcRn. Хотя связывание антитела к человеческому FcRn с человеческим FcRn не блокирует связывание альбумина с FcRn in vitro анализе, если такое ингибирование происходит in vitro, то это может

привести к ускоренному выведению эндогенного мышинового альбумина. Данные показаны на фиг. 1e. Поскольку концентрация альбумина в сыворотке была отчасти вариабельной (от 16,6 до 59,9 мг/мл в группе из 30 мышей, перед инъекцией лекарственного средства в виде антитела к FcRn) для того, чтобы осуществить более легкое сравнение результатов группы, данные альбумина нормализовали и представляли в виде процента концентрации сывороточного альбумина в момент ноль на фиг. 1e. Возобновляемый эффект в отношении концентрации альбумина в плазме может быть результатом введения дозы в форматах Fab'-ПЭГ или FabFv. Дисперсионный анализ (ANOVA) проводили при повторных измерениях, проверяя различия в обработке и различия по времени одновременно. При каждом измерении Fab'-ПЭГ или FabFv-обработанных животных по сравнению с контролем в одном и том же эксперименте в одной и той же временной точке, контроли были иррелевантными (не связывающими FcRn) Fab'-ПЭГ или представляли собой только носитель, соответственно. Эти два формата продемонстрировали снижение концентраций альбумина (при 5% уровне в дисперсионном анализе данных) около 48-72 ч после инъекции лекарственного средства, с уровнями восстановления после этого к уровням до введения лекарственного средства. Максимальное снижение концентрации альбумина в плазме составило около 10% после 100 мг/кг формата Fab'-ПЭГ (48 часов), или около 25% после 250 мг/кг FabFv через 144 часа. Сходный дисперсионный анализ проводили на данных, демонстрирующих эффект 1638 IgG4P в отношении уровня альбумина в плазме (показанный на фиг. 1f). НЕ было отмечено значимого отличия между обработанными и контрольными животными, что подтверждает, что обработка форматом IgG4P или 1638 не влияет на концентрацию альбумина в плазме.

Пример 9. Кристаллическая структура и анализ комплекса 1638.g49 Fab:FcRn.

1638.g49 Fab были совместно кристаллизованы с hFcRn альфа-цепью области ECD (SEQ ID NO: 48) и человеческим бета 2 микроглобулином (SEQ ID NO: 72). Белки были в 50 mM ацетате натрия, 125 mM NaCl pH6, а условия кристаллизации были 0,1 M Tris pH 8,5, 40% ПЭГ400 и 0,2M LiSO₄·H₂O при концентрации белка 10 мг/мл и объемном соотношении капли 0,4 мкл белка на 0,4 мкл резервуар в сидячей капле, в эксперименте диффузии пара. Кристаллам позволяли расти в течение 8-21 дня, после этого их собирали из капли, переносили в луночный буфер (поскольку он уже содержит 40% ПЭГ400) и мгновенно замораживали в жидком азоте (-180°C) в течение 10 с. Рентгеновские данные собирали с SOLEIL с помощью осцилляционного способа. Размер ячейки кристаллов составлял a=101,49 Å, b=210,4 Å, c=101,49 Å; альфа = 90 градусов, бета = 90 градусов и гамма = 90 градусов. Пространственная группа была определена как P2₁2₁2. Молекулярная упаковка была определена с помощью PH aser, и уточнение было проведено с помощью Refmac с использованием данных между 30 и 2,7 Å, для получения конечного R-фактора 21,8% и Rfree 27,2%. Результаты показаны ниже: Остатки, взаимодействующие с 1638.49 Fab', находились в FcRn-цепи (не β2M) и указаны ниже жирным шрифтом в последовательности внеклеточного домена FcRn.

AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPPQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVSW
 YWEKETTDLRIRKEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEEEFMNFDLK
QGTWGGDWPEALAISQRWQQDKAANKELTFLFLFSCPH
 RLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFPPELQLRFLRNGLAAGTGQGD
 FGPNSDGSFHASSSLTVKSGDENHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSS (SEQ II
 NO: 48) .

Подчеркнутые остатки это те, которые, как известно, являются критическими для взаимодействия человеческого FcRn с Fc-областью человеческого IgG. Жирным выделены остатки, которые вовлечены в связывание антитела 1638.49 Fab' при 4 Å. Остатки, выделенные курсивом, это те, которые вовлечены в связывание этого же антитела при 5 Å.

Эпитоп, определенный остатками антитела ближе, чем 4 Å, состоял из: A81, G83, G84, K85, G86, P87, N113, E115, W131, P132, E133, L135, A136, Q139.

Эпитоп, определенный остатками антитела ближе 5 Å, состоял из: A81, G83, G84, K85, G86, P87, N113, E115, W131, P132, E133, L135, A136, Q139, L82, Y88, L112, D130.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент, содержащее тяжелую цепь или фрагмент тяжелой цепи с вариабельной областью, где указанная вариабельная область содержит три CDR, где

CDR H1 имеет последовательность SEQ ID NO: 1,

CDR H2 имеет последовательность SEQ ID NO: 2 и

CDR H3 имеет последовательность SEQ ID NO: 3, и

легкую цепь или ее фрагмент с вариабельной областью, где указанная вариабельная область содержит три CDR, где

CDR L1 имеет последовательность SEQ ID NO: 4,

CDR L2 имеет последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7 и

CDR L3 имеет последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 12 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8.

3. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, которое является гуманизированным.

4. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, содержащие переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 16.

5. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, содержащие переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 59 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51.

6. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, где последовательность переменного домена тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 25 и где последовательность переменного домена легкой цепи по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 16.

7. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.1, где фрагмент представляет собой scFv-, Fv-, Fab- или Fab'-фрагмент.

8. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.7, где Fab'-фрагмент содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 33 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 20.

9. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.7, где Fab'-фрагмент содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 29 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 20.

10. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.5, где Fab'-фрагмент содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 63 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 55.

11. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-10, которое конъюгировано с полимером или альбумином.

12. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.11, где полимер выбран из крахмала и полиэтиленгликоля (ПЭГ).

13. Антитело к FcRn или его связывающий фрагмент по п.12, где полимер представляет собой ПЭГ.

14. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по п.13, где ПЭГ имеет молекулярную массу в диапазоне 5-50 кДа.

15. Антитело к FcRn по любому из пп.1-6, которое является полноразмерным антителом.

16. Антитело к FcRn по п.15, где полноразмерное антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG4 и IgG4P.

17. Антитело к FcRn по п.4, 15 или 16, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 73, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 20.

18. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его связывающий фрагмент представляет собой Fab-dsFv, содержащий тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 42 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 40.

19. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-18, которое блокирует связывание IgG человека с FcRn человека.

20. Антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-19, которое не связывается с β 2-микроглобулином человека (SEQ ID NO: 72).

21. Выделенная молекула ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-20.

22. Выделенная молекула ДНК, кодирующая легкую цепь антитела к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-20.

23. Выделенная молекула ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь антитела к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-20.

24. Клонированный или экспрессируемый вектор, содержащий одну или несколько молекул ДНК по любому из пп.21-23.

25. Вектор по п.24, который содержит:

(i) последовательность SEQ ID NO: 30, 32, 34 или 36 и последовательность SEQ ID NO: 21 или 24, или

(ii) последовательность SEQ ID NO: 38 и последовательность SEQ ID NO: 22, или

(iii) последовательность SEQ ID NO: 74 и последовательность SEQ ID NO: 22, или

(iv) последовательность SEQ ID NO: 41 и последовательность SEQ ID NO: 43.

26. Клетка-хозяин для получения антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-20, которая содержит один или несколько клонированных или экспрессируемых векторов по п.24 или 25.

27. Способ получения антитела или его связывающего фрагмента, обладающего специфичностью связывания к FcRn человека, включающий культивирование клетки-хозяина по п.26 и выделение антите-

ла.

28. Фармацевтическая композиция для лечения аутоиммунного заболевания, содержащая антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-20 в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или носителями.

29. Применение антитела или его связывающего FcRn фрагмента по любому из пп.1-20 в терапии аутоиммунного заболевания.

30. Применение композиции по п.28 в терапии аутоиммунного заболевания.

31. Применение по п.29, где аутоиммунное заболевание выбрано из миастении, пузырчатки обыкновенной, оптиконевромиелита, синдрома Гийена-Барре, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

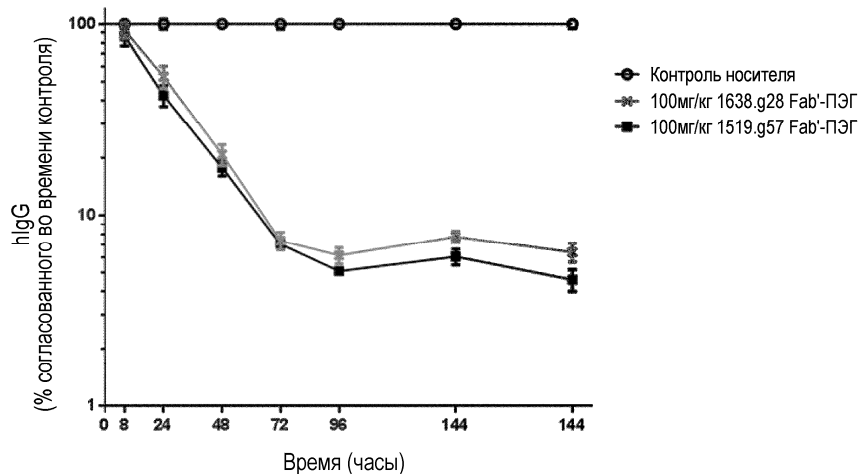
32. Применение по п.30, где аутоиммунное заболевание выбрано из миастении, пузырчатки обыкновенной, оптиконевромиелита, синдрома Гийена-Барре, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

33. Применение композиции, содержащей антитело к FcRn или его связывающий FcRn фрагмент по любому из пп.1-20 в терапии хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIDP), парапротеин-полинейропатии, рефракторной эпилепсии, гемолитической анемии, синдрома Гудпасчера, АВО несоответствия, волчаночного нефрита, почечного васкулита, склеродермы, фиброзирующего альвеолита, дилатационной кардиомиопатии, болезни Грейвса, диабета типа 1, аутоиммунного диабета, пузырчатки, ANCA васкулита, дерматомиозита, болезни Шегрена и ревматоидного артрита.

34. Способ лечения аутоиммунного заболевания у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела к FcRn или его связывающего FcRn фрагмента по любому из пп.1-20 или композиции по п.28.

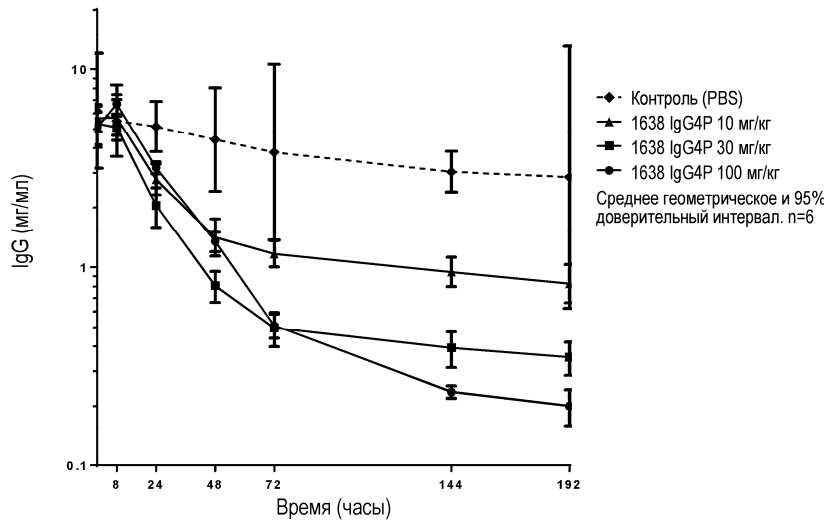
35. Способ по п.34, где аутоиммунное заболевание выбрано из миастении, пузырчатки обыкновенной, оптиконевромиелита, синдрома Гийена-Барре, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

36. Способ лечения заболевания у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела к FcRn или его связывающего FcRn фрагмента по любому из пп.1-20 или композиции по п.28, где заболевание представляет собой хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (CIDP), парапротеин-полинейропатию, рефракторную эпилепсию, гемолитическую анемию, синдром Гудпасчера, АВО несоответствие, волчаночный нефрит, почечный васкулит, склеродерму, фиброзирующий альвеолит, дилатационную кардиомиопатию, болезнь Грейвса, диабет типа 1, аутоиммунный диабет, пузырчатку, ANCA васкулит, дерматомиозит, болезнь Шегрена и ревматоидный артрит.



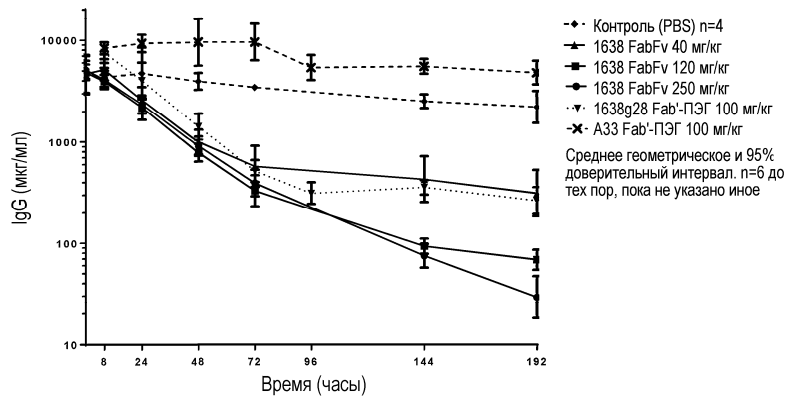
Фиг. 1

Эффект формата 1638 IgG4P в отношении концентрации человеческого IVIg в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn.



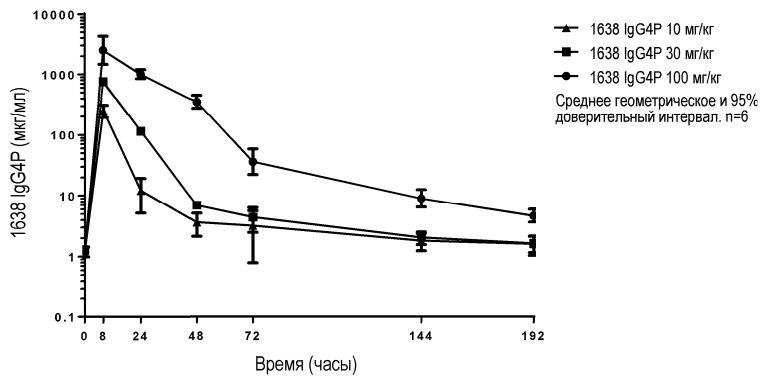
Фиг. 1А

Эффект форматов 1638 FabFv и Fab'-ПЭГ в отношении концентрации человеческого IVIg в сыворотке трансгенных мышей, содержащих человеческий FcRn.



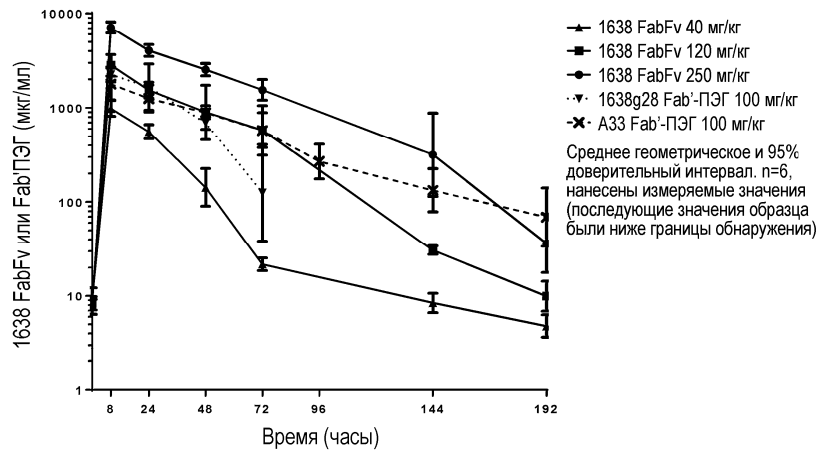
Фиг. 1В

Фармакокинетика формата 1638 IgG4P в трансгенных мышах, содержащих человеческий FcRn



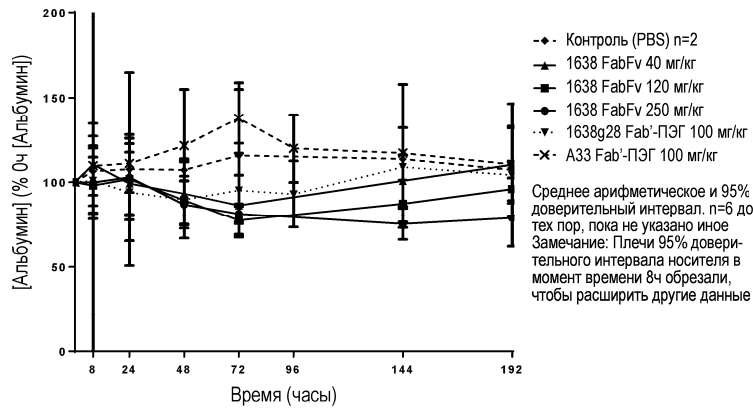
Фиг. 1С

Фармакокинетика форматов 1638 FabFv и Fab'-ПЭГ в трансгенных мышах, содержащих человеческий FcRn



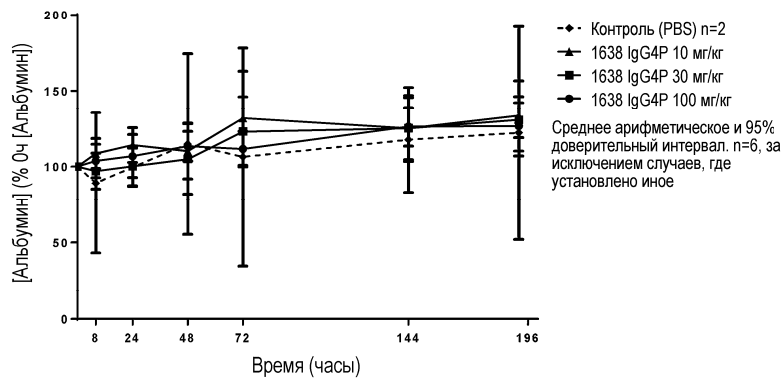
Фиг. 1D

Эффект форматов 1638 FabFv and Fab'-ПЭГ в отношении концентрации сывороточного альбумина в трансгенных мышах, содержащих человеческий FcRn



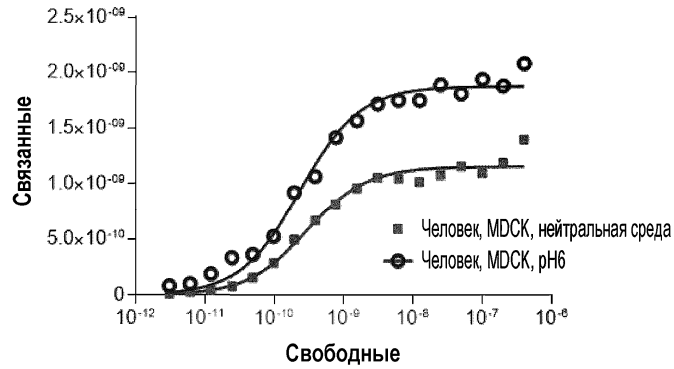
Фиг. 1E

Эффект формата 1638 IgG4P в отношении концентрации сывороточного альбумина в трансгенных мышах, содержащих человеческий FcRn



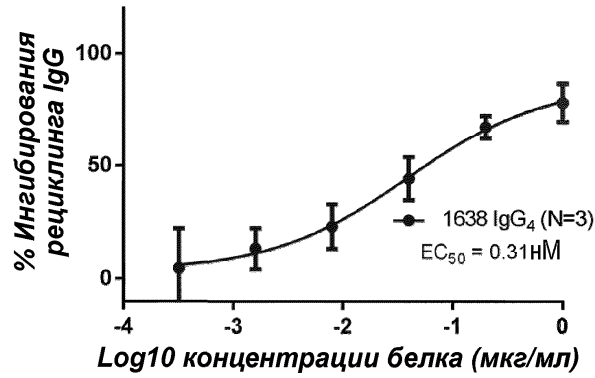
Фиг. 1F

представлены репрезентативные кривые для CA170_1638.g49 IgG4. Средние значения KD (n = 3) составили 0,2 в нейтральном буфере, и 0,22 в кислом буфере, соответственно



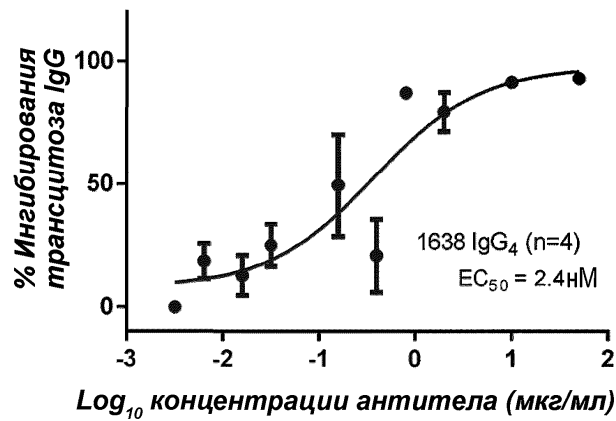
Фиг. 2

представлено, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует рециклинг IgG в клетках MDCK II клон 15



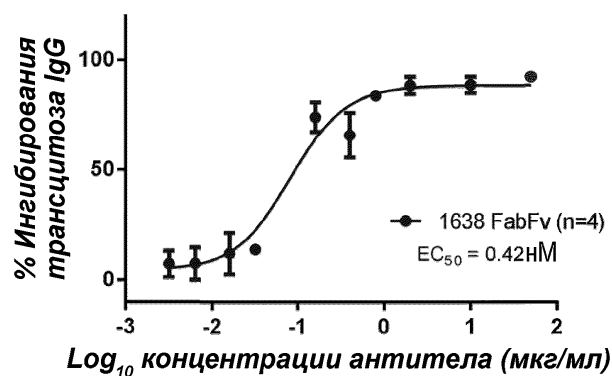
Фиг. 3

представлено, что CA170_1638.g49 IgG4 ингибирует трансцитоз IgG в клетках MDCK II клон 15



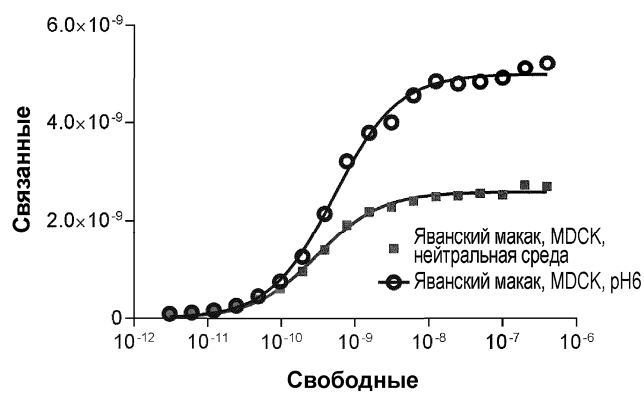
Фиг. 4

представлено, что CA170_1638.g49 FabFv ингибирует
транцитоз IgG в клетках MDCK II клон 15



Фиг. 5

представлено связывание CA170_1638.g49 IgG4 на клетках
MDCK II клон 40 при кислом и нейтральном pH



Фиг. 6

Последовательности антитела CA170_1638

CDRH1	GFSLSTYGVGVG	SEQ ID NO: 1
CDRH2	NIWWDKRYNPSLEN	SEQ ID NO: 2
CDRH3	TPAYYGSHPPFDY	SEQ ID NO: 3
CDRL1	RTSEDIYTNLA	SEQ ID NO: 4
CDRL2	VAKTLQD	SEQ ID NO: 5
CDRL3	LQGFKFPWT	SEQ ID NO: 6
CDRL2 ВАРИАНТ	VAKTLQE	SEQ ID NO: 7

Фиг. 7

VL-область крысиного антитела 1638 SEQ ID NO: 8

DILMTQSPAS LSASLGETIS IECRTSEDIY TNLAWYQQKS GKSPQLLIYV AKTLQDGVPS
RFSGSGSGTH YSLKISGMQP EDEGDYFCLQ GFKFPWTFGG GTKLELK

VL-область крысиного антитела 1638 SEQ ID NO: 9

gacatcctga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactatctcc
atcgaatgtc gaacaagtga agacatttac actaatttag cgtggtacca gcagaagtca
gggaaatctc ctcaactcct gatctatggt gcaaagacgt tgcaagatgg ggtcccatca
cggttcagtg gcagtggatc tggcacgcat tattctctca agatcagcgg catgcaacct
gaagatgaag gggattatth ctgtctgcag ggthtcaagt ttccgtggac gttcgggtga
ggcaccaagc tggaactgaa a

VL-область крысиного антитела 1638 с сигнальными последовательностями, подчеркнутыми и выделенными курсивом SEQ ID NO: 10

MNVPTQFLGL LLLWITDGIC DILMTQSPAS LSASLGETIS IECRTSEDIY TNLAWYQQKS
GKSPQLLIYV AKTLQDGVPS RFSGSGSGTH YSLKISGMQP EDEGDYFCLQ GFKFPWTFGG GTKLELK

VL-область крысиного антитела 1638 с сигнальными последовательностями, подчеркнутыми и выделенными курсивом SEQ ID NO: 11

atgaatgtgc ccactcaatt ccttgggttg ttgctgctgt ggataacaga tggcatatgc
gacatcctga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactatctcc
atcgaatgtc gaacaagtga agacatttac actaatttag cgtggtacca gcagaagtca
gggaaatctc ctcaactcct gatctatggt gcaaagacgt tgcaagatgg ggtcccatca
cggttcagtg gcagtggatc tggcacgcat tattctctca agatcagcgg catgcaacct
gaagatgaag gggattatth ctgtctgcag ggthtcaagt ttccgtggac gttcgggtga
ggcaccaagc tggaactgaa a

VH-область крысиного антитела 1638 SEQ ID NO: 12

QVTLKESGPG ILQPSQTLST TCTFSGFSLT TYGVGVGWIR QPSGKLEWL ANIWWDDDKR
YNPSLENRLT ISKDTSNNA FLKITNVDTA DSATYFCVRT PAYYGSHPPF DYWGQVMVT VS

VH-область крысиного антитела 1638 SEQ ID NO: 13

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctccagac cctcagctctg
acttgactt tctctgggtt tccactgagt acttatggtg tgggtgtggg ctggattcgt
cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcaaacattt ggtgggatga tgataagcgc
tacaatccat ctctggaaa cggactcact atctccaagg acacctcaa caaccaagca
ttcctcaaga tcaccaatgt ggacactgca gatagcgcca catacttctg tgttcggacc
ccggcttact atggcagcca tccccctttt gactactggg gcccaaggagt catggtcaca gtctcg

VH-область крысиного антитела 1638 с сигнальными последовательностями, подчеркнутыми и выделенными курсивом SEQ ID NO: 14

MDRLTSSFL LIVPAYVLSQ VTLKESGPGI LQPSQTLST TCTFSGFSLT YGVGVGWIR
PSGKLEWLA NIWWDDDKRY NPSLENRLTI SKDTSNNAF LKITNVDTAD SATYFCVRTP
AAYGSHPPFD YWGQVMVTV S

VH-область крысиного антитела 1638 с сигнальными последовательностями, подчеркнутыми и выделенными курсивом SEQ ID NO: 15

atggacaggc taacttctc attcctactg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtctcag
gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact
tgcactttct ctgggttttc actgagtact tatgggtggtg gttgggctg gattcgtcag
ccttcaggga aggtctgga gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagcgctac
aatccatctc tggaaaaccg actcactato tccaaggaca cctccaaca ccaagcattc
ctcaagatca ccaatgtgga cactgcagat agcgccacat acttctgtgt tcggaccccg
gcttactatg goagccatcc cccttttgac tactggggcc aaggagtcat ggtcacagtc tcg

Фиг. 8А

1638 gL7 V-область SEQ ID NO: 16

DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRTSEDIY TNLAWYQQKP GKVPKLLIYV AKTLQEGVPS
RFSGSGSGTH YTLTISSLQP EDVATYYCLQ GFKFPWTFGG GTKVEIK

1638 gL7 V-область SEQ ID NO: 17

gatatccaga tgaccsagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
attacctgtc gcsactagcga ggacatctac accaacctgg cgtgggatca gcagaaacca
ggcaaaagtgc cgaaaactgct gatctacgct gcgaaaacc tccaggaagg tgtaccgtct
cgcttttccg gctctggtag cggtaactcac tacaccctga ccatctcttc cctccagccg
gaagatggtg ctacctaacta ttgcctccag ggcttcaaat tcccgtggac tttcgtgggc
ggcacgaaa tggaatcaa a

1638 gL7 V-область (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 18

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRTSEDI YTNLAWYQQK
PGKVPKLLIY VAKTLQEGVP SRFSGSGSGT HYTLTISSLQ PEDVATYYCL QGFKFPWTFG
GGTKVEIK

1638 gL7 V-область (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 19

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttgctg gtttcgctac cgtagcgcaa
gctgatatcc agatgaccsa gactccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgtcgtgtg
actattacct gtcgactag caggacatc tacaccaacc tggcgtggtg tcagcagaaa
ccaggcaaa tgccgaaact gctgatctac gtcgcaaaa ccctccagga aggtgtaccg
tctcgctttt ccggctctgg tagcggtaact cactacacc tgaccatctc ttcctccag
ccggaagatg ttgctaccta ctattgctc cagggttca aattcccgtg gactttcggt
ggcggcacga aagtggaaat caaa

1638 gL7 легкая цепь (V + константная область) SEQ ID NO: 20

DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRTSEDIY TNLAWYQQKP GKVPKLLIYV AKTLQEGVPS
RFSGSGSGTH YTLTISSLQP EDVATYYCLQ GFKFPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSPVTKSFN RGEK

1638 gL7 легкая цепь (V + константная область, экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 21

gatatccaga tgaccsagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
attacctgtc gcsactagcga ggacatctac accaacctgg cgtgggatca gcagaaacca
ggcaaaagtgc cgaaaactgct gatctacgct gcgaaaacc tccaggaagg tgtaccgtct
cgcttttccg gctctggtag cggtaactcac tacaccctga ccatctcttc cctccagccg
gaagatggtg ctacctaacta ttgcctccag ggcttcaaat tcccgtggac tttcgtgggc
ggcacgaaa tggaatcaa acgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcca
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgtg gctgctgaa taacttctat
cccagagagg ccaaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
gagagtgtca sagagcagga sagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaa sagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcac sagtaacaaa aagttttaat agagggaggt gt

(сигнальные последовательности, подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8В

1638 gL7 легкая цепь (V + константная область, экспрессия в клетках млекопитающих)

SEQ ID NO: 22

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcca tcgtgtgact
 attacctgtc gcaactagc ggacatctac accaacctgg cgtgggatca gcagaaacca
 ggcaaagtgc cgaactgct gatctacgtc gcgaaaacc tccaggaagg tgtaccgtct
 cgcttttccg gctctggtag cggactcac tacaccctga ccatctcttc cctccagccg
 gaagatggtg ctacctacta ttgcctccag ggcttcaaat tcccgtggac tttcgggtggc
 ggcacgaaag tggaaatcaa acggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccacc
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtcgtgt gctgctgaa caactctac
 ccccgcgagc ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag
 gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac agcacctact cctgtcctc caccctgacc
 ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc

1638 gL7 легкая цепь (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 23

MKKTALAIAY ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDV TITCRTSEDI YTNLAWYQQK
 PGKVPKLLIY VAKTLQEGVP SRFSGSGSGT HYTLTISSLQ PEDVATYYCL QGFKFPWTFG
 GGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS
 QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVVACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

1638 gL7 легкая цепь (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 24

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgtcgtgtg
 actattacct gtcgactag cgaggacatc tacaccaacc tggcgtggta tcagcagaaa
 ccaggcaaaag tgccgaaact gctgatctac gtcgcaaaa cctccagga aggtgtaccg
 tctcgctttt ccggctctgg tagcgtact cactacacc tgaccatctc ttcctccag
 ccggaagatg ttgctaccta ctattgcctc cagggcttca aattcccggt gactttcgt
 ggcggcacga aagtggaaat caaacgtacg gtagcggccc catctgtctt catcttccc
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataactc
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc
 caggagatg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
 acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag
 gcctgagct caccagtaac aaaaagtgtt aatagagggg agtgt

1638 gH33 V-область SEQ ID NO: 25

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSL S TYGVGVGWR QAPGKGLEWL ANIWWDDDKR
 YNPSLENRFT ISRDNKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCART PAYYGSHPF DYWGQGTMTV VS

1638 gH33 V-область SEQ ID NO: 26

gaggttcagc tggtcagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
 tcttgtgcag cgtccgctt ctctctgtct acctacggcg ttgggtgttg ttgggtacgt
 caggctccag gtaaaggctt ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
 tacaaccgct ccctggagaa ccgcttcacc attagccgtg ataacgcgaa aaactccgcg
 tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtactattg cgcgcgact
 ccggcgtact atggctctca cccaccgtt gattactggg gtcagggtac aatgggtacc gtctcg

1638 gH33 V-область (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 27

MKKTALAIAY ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFSL STYGVGVGWV
RQAPGKLEW LANIWWDDDK RYNPSLENRF TISRDNKNS AYLQMNSLRA EDTAVYYCAR
TPAYYGSHPF FDYWGQGTMTV TVS

(сигнальные последовательности подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8С

1638 gH33 V-область (экспрессия в E.coli) SEQ ID NO: 28

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgctg
ctctcttggtg cagcgtccgg cttctctctg tctacctacg gcgttggtgt tggttgggta
cgctcaggctc caggtaaagg tctggaatgg ctcgcaaaaca tctggtggga cgacgataaa
cgctacaacc cgtccctgga gaaccgcttc accattagcc gtgataacgc gaaaaactcc
gcgtatctcc agatgaactc cctgcgctgcc gaagacacgg ctgtgtacta ttgcgcgcgc
actccggcgt actatggctc tcaccaccgg tttgattact ggggtcaggg taccatggtt
accgtctcg

1638 gH33 Fab тяжелая цепь (V + CH1 человеческой цепи гамма) SEQ ID NO: 29

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLs TYGVGVGWR QAPGKGLEWL ANIWWDDDKR
YNPSENRF ISRDNAKNSA YLQMNSLRAE DAVYYCART PAYYGSHPPF DYWGQGTMTV
VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDK VEPKSC

1638 gH33 Fab тяжелая цепь (V + CH1 человеческой цепи гамма) SEQ ID NO: 30

gaggttcagc tggctgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
tcttgtagc cgtccggctt ctctctgtct acctacggcg ttggtgttg tgggtacgt
caggctccag gtaaaggctt ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
tacaaccctg ccctggagaa ccgcttcacc attagcctg ataacgcgaa aaactccgcg
tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtaactattg cgcgcgact
ccggcgtact atggctctca cccaccgctt gattactggg gtcagggtac catggttacc
gtctcagcgc cttctacaaa gggcccacgc gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg
acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta
cagtcctcag gactctact cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagctggggc
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt cgacaagaaa
gttgagccca aatcttgt

1638 gH33 Fab тяжелая цепь (V + CH1 человеческой цепи гамма) SEQ ID NO: 31

MKTAIAIAV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFSL STYGVGVGWR
RQAPGKGLEW LANIWWDDDK RYNPSENRF TISRDNAKNS AYLQMNSLRA EDTAVYYCAR
TPAYYGSHPP FDYWGQGTMTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP
VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLs SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

1638 gH33 Fab тяжелая цепь (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 32

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgctg
ctctcttggtg cagcgtccgg cttctctctg tctacctacg gcgttggtgt tggttgggta
cgctcaggctc caggtaaagg tctggaatgg ctcgcaaaaca tctggtggga cgacgataaa
cgctacaacc cgtccctgga gaaccgcttc accattagcc gtgataacgc gaaaaactcc
gcgtatctcc agatgaactc cctgcgctgcc gaagacacgg ctgtgtacta ttgcgcgcgc
actccggcgt actatggctc tcaccaccgg tttgattact ggggtcaggg taccatggtt
accgtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag
agcacctctg ggggcacagc ggcctggggc tgctgggca aggactactt cccggaaccg
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgacacactt cccgctgctc
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagctg
ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacca ggtcgacaag
aaagttgagc ccaaactctg t

(сигнальные последовательности подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8D

1638 gH33 Fab' тяжелая цепь (V + CH1 человеческой цепи гамма + шарнир) SEQ ID NO: 33
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSL S TYGVGVGWR QAPGKLEWL ANIWWDDDKR
 YNP SLENRFT ISRDNAKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCART PAYYGSHPPF DYWGQGMVT
 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKT H TCAA

1638 gH33 Fab' тяжелая цепь (V + CH1 человеческой цепи гамма + шарнир) SEQ ID NO: 34
 gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
 tcttgtgcag cgtccggctt ctctctgtct acctacggcg ttgggtgttg ttgggtacgt
 caggctccag gtaaaggctt ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
 tacaaccctt ccctggagaa ccgcttcacc attagccgtg ataacgcgaa aaactccgcg
 tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtactattg cgcgcgact
 ccggcgtact atggctctca cccaccgttt gattactggg gtcagggtac catggttacc
 gtctcgagcg cttctacaaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg
 acgggtgctg ggaactcagg cgcctcagc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgacc tgcctccag cagcttgggc
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt cgacaagaaa
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcgccg cg

1638 gH33 Fab' тяжелая цепь (экспрессия в E.) SEQ ID NO: 35

MKKTATATAV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFSL STYGVGVGWR
 RQAPGKLEW LANIWWDDDK RYNP SLENRFT TISRDNAKNS AYLQMNSLRA EDTAVYYCAR
 TPAYYGSHPP FDYWGQGMV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP
 VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSL S SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKT HTCAA

1638 gH33 Fab' тяжелая цепь (экспрессия в E.) SEQ ID NO: 36

atgagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gagcctgctg
 ctctcttgtg cagcgtccgg cttctctctg tctacctacg gcgttgggtg ttggtgggta
 cgtcaggctc caggtaaagg tctggaatgg ctcgcaaca tctgggtggga cgacgataaa
 cgctacaacc cgtccctgga gaaccgcttc accattagcc gtgataacgc gaaaaactcc
 gcgtatctcc agatgaactc cctgcgtgce gaagacacgg ctgtgtacta ttgcgcgcgc
 actccggcgt actatggctc tcaaccaccg tttgattact ggggtcaggg taccatgggt
 accgtctcga gcgcttctac aaagggccca tgggtcttcc ccctggcacc ctctccaag
 agcacctctg ggggcaacgc ggcctcgggc tgcctgggtca aggactactt ccccgaaaccg
 gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcaacactt cccggtgctc
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtg ccgtgccctc cagcagcttg
 ggcaccsaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacaa ggtcgacaag
 aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcg ccgcg

1638 gH33 IgG4 тяжелая цепь (V + константная область 4P человеческой гамма цепи)

SEQ ID NO: 37

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSL S TYGVGVGWR QAPGKLEWL ANIWWDDDKR
 YNP SLENRFT ISRDNAKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCART PAYYGSHPPF DYWGQGMVT
 VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVNDH KPSNTKVDKR VESKYGPSCP PCPAPEFLGG
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE
 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSV MNEALHNHYT QKSLSLSLGK

(сигнальные последовательности подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8E

1638 gH33 IgG4 тяжелая цепь (V + константная область 4P человеческой гамма цепи) SEQ ID NO: 38

```

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc
tcttgtgcag cgtccggctt ctctctgtct acctacggcg ttgggtgttg ttgggtacgt
caggctccag gtaaaggctt ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
tacaaccggt ccctggagaa ccgcttcacc attagccgtg ataacgcgaa aaactccgcg
tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtactattg cgcgcgcact
ccggcgtaact atggctctca cccaccgttt gattactggg gtcagggtac aatgggtacc
gtctcgtctg cctccacca gggcccctcc gtgttcctc ttggcccctg ctcccggctc
acctccgagt ctaccgccgc tctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgagcccgtg
acagtgtcct ggaactctgg cgccctgacc tccggcgtgc acaccttccc tgcctgtgctg
cagtccctccg gcctgtactc cctgtcctcc gtcgtgaccg tgccctcctc cagcctggggc
accaagacct acacctgtaa cgtggaccac aagccctcca acaccaaggt ggacaagcgg
gtggaatcta gtaactccct tccctgccc ccctgcccctg cccctgaatt ctggggccga
ccttccgctg tctgttccc cccaaagccc aaggacacc tgatgatctc cgggacccc
gaagtgcact gcgtggtggt ggacgtgtcc caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc ccagagagga acagttcaac
tccacctacc ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa
gagtacaagt gcaagggtgc caacaaggc ctgccctcca gcatcgaaaa gaccatctcc
aaggccaagg gccagccccg cgagccccag gtgtacacc tgccccctag ccaggaagag
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctgggtcaagg gcttctacc ctccgacatt
gccgtggaat ggaagtccaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg
ctggacagcg acgctcctt cttcctgtac tctcggctga ccgtggacaa gtcccgggtg
caggaaggca acgtcttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa cactacacc
cagaagtccc tgtcccctgag cctgggcaag

```

1638 gH33 IgG4 тяжелая цепь (V + константная область 4P гамма цепи млекопитающих, нет с-концевого lys) SEQ ID NO: 39

```

EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFSSTY VGVGVGVRQA PGKGLEWLAN IWWDDDKRYN
PSLENRFTIS RDNAKNSAYL QMNSLRAEDT AVYYCARTPA YYGSHPPFDY WGQGTMTVTS
SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
SGLYSLSSV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG

```

1638 gL7 FabFv легкая цепь SEQ ID NO: 40

```

DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRTSEDIY TNLAWYQQKP GKVPKLLIYV AKTLQEGVPS
RFSGSGSGTH YTLTISSLQP EDVATYYCLQ GFKFPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVEIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECSGGGSG GGGSGGGSD IQMTQSPSSV
SASVGRVTI TCQSPSPVWS NFLSWYQQKP GKAPKLLIYE ASKLTSGVPS RFSGSGSGTD
FTLTISSLQP EDFATYYCGG GYSSISDTTF GCGTKVEIKR T

```

(сигнальные последовательности подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8F

1638 gL7 FabFv легкая цепь SEQ ID NO: 41

gataatccaga tgaccsagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
 attacctgtc gactagcga ggacatctac accaacctgg cgtgggatca gcagaaacca
 ggcaaatgct cgaactgct gatctacgtc gcgaaaacc tccaggaagg tgtaccgtct
 cgcttttccg gctctggtag cggtaactac tacaccctga ccatctcttc cctccagccg
 gaagatggtg ctacctacta ttgctccag ggcttcaaat tcccgtggac tttcgggtggc
 ggacgaaag tggaaatcaa acgtacggta ggggccccat ctgtcttcat cttcccgccca
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgtctgaa taacttctat
 cccagagagg ccaaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
 gagagtgtca cagaagcaga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag cacctgacg
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtgggtggagg tggctctggc
 ggtgggtggct ccggagggcg aggaagcagc atccagatga cccagagccc ttcctctgta
 agcggcagtg tcggagacag agtgactatt acctgcaaaa gctccccttc agtctggctc
 aatcttctat cctggtatca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa
 gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaaactgac
 tttaccctga caatctctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga
 ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcgcca ctaaagtgga aatcaagcgt acc

1638 gH33 FabFv тяжелая цепь SEQ ID NO: 42

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLY TYGVGVGWR QAPGKGLEWL ANIWWDDDKR
 YNPSLENRFT ISRDNKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCART PAYYGSHPFP DYWGQGTMTV
 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCSGGG GSGGGGTGGG
 GSEVQLLESG GGLVQPGGSL RLSCAVSGID LSNYAINWVR QAPGKCLEWI GIIWASGTF
 YATWAKGRFT ISRDNKNTV YLQMNSLRAE DTAVYYCART VPGYSTAPYF DLWGQGTTLVTV VSS

1638 gH33 FabFv тяжелая цепь SEQ ID NO: 43

gaggttcagc tggctcagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggagg cctgcgtctc
 tcttgtgcag cgtccggctt ctctctgtct acctacggcg ttgggtgttg ttgggtacgt
 caggctccag gtaaaggtct ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
 tacaaccgct ccctggagaa ccgcttcacc attagccgtg ataacgcgaa aaactccgcy
 tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtactattg cgcgcgcaact
 ccggcgtact atggctctca cccaccggtt gattactggg gtcagggtac aatgggtacc
 gtctcgtccg cttctacaaa gggcccacgc gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg
 accggtgctgt gaaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta
 cagtcctctg gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaaa
 gttgagccca aatcttgttc cggagggtggc ggttccggag gtggcgggtac aggtggcgggt
 gggctccgaag tccagctgct tgaatccgga ggcggactcg tgcagcccgg aggcagctct
 cgcttctcct gcgctgtatc tggaaatcagc ctgagcaatt acgcatcaa ctgggtgaga
 caggcacctg gaaatgcct cgaatggatc ggcattatat gggctagtgg gacgacctt
 tatgctacat gggcgaagg tagattcaca atctcacggg ataatagtaa gaacacagtg
 tacctgcaga tgaactccct gcgagcagag gataccgccc tttactattg tgctcgcaact
 gtcccagggt atagcactgc accctacttt gatctgtggg ggcagggcac tctgggtcacc
 gtctcgtcc

Акцепторная каркасная последовательность JK4 человеческого IGKV1-27 SEQ ID NO: 44

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWYQQKPK GKVPKLLIYA ASTLQSGVPS
 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQK YNSAPLTFGG GTKVEIK

(сигнальные последовательности подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8G

Акцепторная каркасная последовательность JK4 человеческого IGKV1-27 SEQ ID NO: 45

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctgggatca gcagaaacca
 gggaaagtcc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct
 cggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaaag tataacagtg cccctctcac tttcggcgga
 gggaccaagg tggagatcaa a

Акцепторная каркасная последовательность JH3 человеческого IGHV3-7 SEQ ID NO: 46

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY
 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDA FDVWQGTMV TVSS

Акцепторная каркасная последовательность JH3 человеческого IGHV3-7 SEQ ID NO: 47

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgct
 tttgatgtct gggggccaagg gacaatggtc accgtctctt ca

Внеклеточная последовательность альфа-цепи человеческого FcRn SEQ ID NO: 48

AESHLSLLYH LTAVSSPAPG TPAFWVSGWL GPQQYLSYNS LRGEAEPCGA WWENQVSWY
 WEKETDLRI KEKLFLEAFK ALGGKGPYTL QGLLGCELGP DNTSVPTAKF ALNGEEFMNF
 DLKQGTWGGD WPEALAISQR WQQDKAANK ELTFLLFSCP HRLREHLERG RGNLEWKEPP
 SMRLKARPS PGFSVLTCSA FSFYPPQL RFLRNGLAAG TGQGDFGPN DGSFHASSSL
 TVKSGDENHY CCIVQHAGLA QPLRVELESP AKSS

Крысиный $\beta 2M$ SEQ ID NO: 49

IQKTPQIQVY SRHPPENGKP NFLNCYVSQF HPPQIEIELL KNGKKIPNIE MSDLSFSKDW
 SFYILANTEF TPTEVDVYAC RVKHVTLKEP KTVTWDRDM

Человеческий $\beta 2M$, включающий сигнальную последовательность SEQ ID NO: 50

MSRSVALAVL ALLSLSGLEA IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLL
 KNGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTLSP KIVKWDRDM

1638gL2 V-область SEQ ID NO: 51

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRTSEDIY TNLAWYQQKP GKVPKLLIYV AKTLQDGVPS
 RFSGSGSGTH YTLTISSLQP EDVATYYCLQ GFKFPWTFGG GTKVEIK

1638gL2 V-область SEQ ID NO: 52

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcca tcgtgtgact
 attacctgtc gacttagcga ggacatctac accaacctgg cgtgggatca gcagaaacca
 ggcaaagtgc cgaactgct gatctacgct gcgaaaacc tccaggacgg tgtaccgtct
 cgcttttccg gctctggtag cggtactcac tacaccctga ccatctctt cctccagccg
 gaagatgttg ctacctacta ttgcctccag ggcttcaaat tcccgtggac tttcgggtggc
 ggcacgaaag tggaaatcaa a

(сигнальные последовательности подчеркнутые и выделенные курсивом)

Фиг. 8H

1638 gL2 V-область (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 53

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRTSEDI YTNLAWYQQK
PGKVPKLLIY VAKTLQDGVV SRFSGSGSGT HYTLTISSLQ PEDVATYYCL QGFKFPWTFG
GGTKVEIK

1638 gL2 V-область (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 54

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa
gctgatatcc agatgacca gactccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg
actattacct gtcgactag cgaggacatc tacaccaacc tggcgtggta tcagcagaaa
ccaggcaaag tgccgaaact gctgatctac gtcgcgaaaa ccctccagga cgggtgtaccg
tctcgctttt ccggctctgg tagcgtact cactacaccc tgaccatctc ttccctccag
ccggaagatg ttgctaccta ctatgcctc cagggcttca aattcccgtg gactttcggg
ggcggcacga aagtggaaat caaa

1638 gL2 V-область (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 55

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRTSEDIY TNLAWYQQKP GKVPKLLIYV AKTLQDGVPS
RFSGSGSGTH YTLTISSLQP EDVATYYCLQ GFKFPWTFGG GTKVEIKRTV AAPS VFIFFP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

1638 gL2 легкая цепь (V + константная область, с оптимизацией кодонов для экспрессии в E. coli) SEQ ID NO: 56

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcca tcgtgtgact
attacctgtc gactagcga ggacatctac accaacctgg cgtggatca gcagaaacca
ggcaaagtgc cgaactgct gatctacgtc gcgaaaacc tccaggacgg tgtaccgtct
cgcttttccg gctctggtag cggactcac tacaccctga ccatctcttc cctccagccg
gaagatggtg ctacctacta ttgcctccag ggcttcaaat tcccgtggac tttcgggtggc
ggcacgaaag tggaaatcaa acgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcc
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgggt gcctgctgaa taacttctat
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcac cagtaacaaa aagttttaat agaggggagt gt

1638 gL2 легкая цепь (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 57

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRTSEDI YTNLAWYQQK
PGKVPKLLIY VAKTLQDGVV SRFSGSGSGT HYTLTISSLQ PEDVATYYCL QGFKFPWTFG
GGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS
QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKHK VYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEN

(1638.g2=gL2 gH2) сигнальные последовательности подчеркнуты и выделены курсивом

Фиг. 8I

1638 gL2 легкая цепь (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 58

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa
gctgatatcc agatgaccsa gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg
actattacct gtcgcaactag cgaggacatc tacaccaacc tggcgtggta tcagcagaaa
ccaggcaaaag tgccgaaact gctgatctac gtcgcaaaa ccctccagga cgggtgtaccg
tctcgcctttt ccggctctgg tagcgtact cactacacc tgaccatctc ttccctccag
ccggaagatg ttgtacctt ctattgcctc cagggcttca aattcccgtg gactttcggg
ggcggcacga aagtggaaat caaacgtacg gtagcggccc catctgtctt catcttcccg
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc
tatcccagag agccsaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag
ggcctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg agtgt

1638gH2 V-область SEQ ID NO: 59

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAFSGFSL TYGVGVGWR QAPGKGLEWL ANIWWDGDKR
YNPSLENRFT ISKDTAKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCVRT PAYYGSHPPF DYWGQGTMTV VS

1638gH2 V-область SEQ ID NO: 60

gaggttcagc tggctgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
tcttgtgcat tctccggctt ctctctgtct acctacggcg ttggtgttg ttgggtacgt
caggctccag gtaaaggctt ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
tacaaccctt ccctggagaa ccgcttcacc attagcaaag ataccgcgaa aaactccgcg
tatctccaga tgaactccct gcgtccgaa gacacggctg tgtactattg cgttcgact
ccggcgtact atggtcttca cccaccgtt gattactggg gtcagggtac catgggtacc gtctcg

1638 gH2 V-область с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и выделенной курсивом (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 61

MKKTALAIIV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAFSGFSL STYGVGVGWV
RQAPGKLEW LANIWWDGDK RYNPSLENRF TISKDTAKNS AYLQMNSLRA EDTAVYYCVR
TPAYYGSHPP FDYWGQGTMTV TVS

1638 gH2 V-область с сигнальной последовательностью, подчеркнутой и выделенной курсивом (экспрессия в E. Coli) SEQ ID NO: 62

atgagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtagcgcaa
gctgagggtt agctggtcga gtctggaggc gggctgtcc agcctggagg gaggctgcgt
ctctcttctg cattctccgg cttctctctg tctacctacg gcgttgggtg ttggtgggta
cgtcaggctc caggtaaagg tctggaatgg ctcgcaaaaca tctggtggga cgacgataaa
cgctacaacc cgtccctgga gaaccgctt accattagca aagataccgc gaaaaactcc
gcgtatctcc agatgaactc cctgcgtgcc gaagacacgg ctgtgtacta ttgcgttcgc
actccggcgt actatggctc tcaccaccg tttgattact ggggtcaggg taccatggtt
accgtctcg

1638 gH2 Fab' тяжелая цепь (V + CH1 человеческой гамма цепи + шарнир) SEQ ID NO: 63

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAFSGFSL TYGVGVGWR QAPGKGLEWL ANIWWDGDKR
YNPSLENRFT ISKDTAKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCVRT PAYYGSHPPF DYWGQGTMTV
VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTRKVDK VEPKSCDKTH TCAA

Фиг. 8J

1638 gH2 Fab' тяжелая цепь (V + CH1 человеческой гамма цепи + шарнир) SEQ ID NO: 64

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc
 tcttgtgcat tctccggctt ctctctgtct acctacggcg ttggtgttgg ttgggtacgt
 caggctccag gtaaaggtct ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
 tacaaccctt ccctggagaa ccgcttcacc attagcaaaag ataccgcgaa aaactccgcg
 tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtactattg cgttcgcact
 ccggcgctact atggctctca cccaccgttt gattactggg gtcagggtag catggttacc
 gtctcgagcg cttctacaaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg
 acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacctccc ggctgtccta
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggc cgacaagaaa
 gttgagccca aatcttctga caaaactcac acatgcgccg cg

1638 gH2 Fab' тяжелая цепь (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 65

MKKTALAIJAV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAFSGFSL STYGVGVGWV
 RQAPGKGLEW LANIWWDDDK RYNPSLENRF TISKDTAKNS AYLQMNSLRA EDTAVYYCVR
 TPAYYGSHPP FDYWGQGTMV TVSSASTKGF SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP
 VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLV SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKT HTCAA

1638 gH2 Fab' тяжелая цепь (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 66

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
gctgaggttc agctggctga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gagcctgcgt
 ctctcttggtg cattctccgg cttctctctg tctacctacg gcgttggtgt ttggtgggta
 cgtcaggctc caggtaaagg tctggaatgg ctcgcaaaaca tctggtggga cgacgataaa
 cgctacaacc cgtccctgga gaaccgcttc accattagca aagataccgc gaaaaactcc
 gcgtatctcc agatgaaactc cctgcgtgcc gaagacacgg ctgtgtacta ttgcgttcgc
 actccggcgt actatggctc tcaccaccg tttgattact ggggtcaggg taccatggtt
 accgtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag
 agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg
 gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
 ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacca ggtcgacaag
 aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgag ccgcg

Человеческий β 2-микроглобулин SEQ ID NO: 72

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVENHSDLSFSKDW
SYLLYYTEFTPT
 EKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM

Сигнальные последовательности подчеркнуты и выделены курсивом
 Фиг. 8К

1638gH33 IgG1 тяжелая цепь (V + константная область-1 человеческой гамма цепи) SEQ ID NO: 73

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLT TYGVGVGWVR QAPGKGLEWL
ANIWWDKDR YNPSLENRFT ISRDNAKNSA YLQMNSLRAE DTAVYYCART
PAYYGSHPPF DYWGQGTMTV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVIV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKQPR
EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PFVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLT
PGK

```

1638gH33 IgG1 тяжелая цепь (V + константная область-1 человеческой гамма цепи, экзоны подчеркнуты) SEQ ID NO: 74

```

gaggttcagc tggctcagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
tcttgtgcag cgtccggctt ctctctgtct acctacggcg ttggtgttg ttgggtacgt
caggctccag gtaaaggctt ggaatggctc gcaaacatct ggtgggacga cgataaacgc
tacaaccgct ccctggagaa ccgcttcacc attagccgtg ataacgcgaa aaactccgct
tatctccaga tgaactccct gcgtgccgaa gacacggctg tgtactattg cgcgcgact
ccggcgact atggctctca cccaccgttt gattactggg gtcagggtac aatggttacc
gtctcagagc cttctacaaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt cgacaagaaa
gttgggtgaga ggccagcaca gggaggaggt gtgtctgctg gaagccaggc tcagcgtcc
tgcttgagc catcccggct atgcagcccc agtccagggc agcaaggcag gccccgtctg
cctcttcacc cggaggcctc tgcccgcctc actcatgctc agggagaggg tcttctggct
ttttccccag gctctgggca ggcacaggct aggtgccct aaccaggcc ctgcacacaa
aggggcaggt gctgggctca gacctgcaa gagccatctc cgggaggacc ctgcccctga
cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag ctgggacacc ttctctcctc
ccagatctga gtaactccca atcttctctc tgcagagccc aaatcttgtg acaaaactca
cacatgccc cctgcccag gtaagccagc ccaggcctcg ccctccagct caaggcggga
cagggtgccct agagtagcct gcatccaggg acaggcccca gccgggtgct gacacgtcca
cctccatctc ttctcagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc
caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg
acgtgagcca cgaagacct gagggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtc
ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg
tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca
acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggt gggaccgctg
gggtgagag gccacatgga cagaggccgg ctcgcccac cctctgccct gagagtgacc
gctgtacca cctctgtccc tacagggcag ccccgagaac cacagggtgta caccctgccc
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgaggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag
accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgct ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg
cacaaccact acacgcagaa gaggcctctc ctgtctccgg gtaaa

```

Фиг. 8L

ПРИВИТАЯ ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ 1638

```

1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95  100 105
Легкая цепь 1638  DIIMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYTNLAWYQQKSGKSPQLLIYVAKTLQDGVPSRFRSGSGSGTHYSLKISGMQPEDEGDYPCLQGFKEPWTFGGGTKLELK
IGKV1-27         DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPVSRFRSGSGSGTDFLLTISLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIK
1638gL7         DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRTSEDIYTNLAWYQQKPGKVPKLLIYVAKTLQEYGVPSRFRSGSGSGTHYLLTISLQPEDVATYYCLQGFKEPWTFGGGTKVEIK

```

Подписи

1638 = крысиная последовательность переменной области легкой цепи

1638gL7 = Гуманизированная прививка 1638 переменной области легкой цепи с использованием человеческой зародышевой последовательности IGKV1-27 в качестве акцепторного каркаса

CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты

Донорные остатки показаны жирным шрифтом/курсивом и выделены: H70 и Y71

Мутация в CDR2 для удаления сайта потенциальной изомеризации аспарагиновой кислоты показана жирным шрифтом/подчеркнута и выделена: E56

Фиг. 9А

ПРИВИТАЯ ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ 1638

```

1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  a 55  60  65  70  75  80  abc 85  90  95  100  105 110
Тяжелая цепь 1638  QVTLKESGGPILQPSTLSLTCTFSGFSLSTYGVGVGNIRQPSGKGLEWLANITW-WDDDKRYNPSLENRLTISKDTSNNOAFLKLTNVDIADSAIYPCVRTPAYYGSHPPFDYWGQGMVTVS
IGHV3-7         EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS--YWMSNVRQAPGKGLEWVANIKQDSEKYYDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----DAFDVWGQGMVTVS
1638gH33        EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTYGVGVGNIVRQAPGKGLEWVANIWWDDDKRYNPSLENRLTISRDNAKNSYLQMNSLRAEDTAVYYCARTPAYYGSHPPFDYWGQGMVTVS

```

Подписи

Донорные остатки показаны жирным шрифтом/курсивом и выделены: L48 и A78

CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты

1638gL7 = Гуманизированная прививка 1638 переменной области тяжелой цепи с использованием человеческой зародышевой последовательности IGHV3-7 в качестве акцепторного каркаса

1638 = крысиная последовательность переменной области тяжелой цепи

Фиг. 9В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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