

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035269**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.05.22**

**(21)** Номер заявки  
**201790314**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.08.13**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛО, НАПРАВЛЕННОЕ НА Fc-ГАММА-РЕЦЕПТОР IIВ И Fc-ЭПСИЛОН-РЕЦЕПТОР**

---

**(31)** 14002825.9

**(32)** 2014.08.13

**(33)** EP

**(43)** 2017.06.30

**(86)** PCT/EP2015/068667

**(87)** WO 2016/023985 2016.02.18

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЗУПРЕМОЛЬ ГМБХ (DE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Карле Анна, Диренбергер Каролин,  
Сондерман Петер, Мюллер Мартина,  
Рит Николе, Поль Томас (DE)**

**(74)** Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

**(56)** WO-A2-2006/028956

WO-A2-02/088317

ZHU D. ET AL.: "A novel human immunoglobulin Fcgamma-Fcepsilon bifunctional fusion protein inhibits FcepsilonRI-mediated degranulation", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 5, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 518-521, XP002976663, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM0502-518, abstract, pages 519-520, figures, material and methods

US-A1-2009/074771

WO-A2-2005/051999

EP-A1-2837637

TAM S.W. ET AL.: "A bispecific antibody against human IgE and human FcgammaRII that inhibits antigen-induced histamine release by human mast cells and basophils", ALLERGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, UNITED KINGDOM, vol. 59, no. 7, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 772-780, XP002387216, ISSN: 0105-4538, abstract, figures

---

**(57)** Изобретение относится к антителу, которое связывается с помощью первого связывающего домена с Fc-эпсилон-рецептором I типа (FcεRI) и с помощью второго связывающего домена с Fc-гамма-рецептором IIВ (FcγRIIВ). Изобретение также относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, вектору, содержащему по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновой кислоты, клетке-хозяину, трансфицированной последовательностью нуклеиновой кислоты или вектором, фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента антитело, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина, а также к применению антитела для лечения или профилактики аллергии на пыльцу.

---

**B1**

**035269**

**035269**

**B1**

Антитело связывается с антигеном и нейтрализует его посредством предотвращения его связывания со своей эндогенной мишенью (например, рецептором или лигандом) или посредством индуцирования эффекторных ответов, которые приводят к удалению антигена. Для эффективного удаления и/или разрушения антигенов, чужеродных для организма, антитело должно проявлять как высокую аффинность к своему антигену, так и эффективные эффекторные функции. Антитела с полиспецифичностью (такие как, например, биспецифические антитела) применимы для опосредования комплементарных или синергических ответов на несколько антигенов.

Эффекторные функции антитела опосредованы Fc-областью антитела. Эффекторные функции подразделяются на две категории: (1) эффекторные функции, которые действуют после связывания антитела с антигеном (данные функции подразумевают участие системы комплемента или клеток, несущих Fc-рецептор (FcR)); и (2) эффекторные функции, которые действуют независимо от связывания с антигеном (данные функции обеспечивают персистирование антитела в кровотоке и его способность к переносу через клеточные барьеры путем трансцитоза). Поскольку Fc-рецепторы опосредуют эффекторную функцию антитела путем связывания с Fc-областью когнатного антитела рецептора, FcR определяют по их специфичности к изотипам иммуноглобулинов: Fc-рецепторы, специфичные для антител IgG, обозначают как FcγR; Fc-рецепторы антител IgE обозначают как FcεR; Fc-рецепторы антител IgA обозначают как FcαR и так далее.

Были идентифицированы три подкласса FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD 16). FcγRIII характеризуется наличием мотива ITIM (консенсусная последовательность: V/I-X-Y-X<sub>2</sub>-V/L, Isakov (1997), *Immunol Res.* 16, 85-100) в цитоплазматическом домене, который фосфорилируется киназой Lyp при связывании с агрегатами Ig или IC и колигировании с несущими ITAM активирующими Fcγ-рецепторами. Фосфорилированный ITIM привлекает SH2-домен инозитолполифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), которая, в свою очередь, гидролизует фосфоинозитольные мессенджеры, высвобождаемые в результате активации тирозинкиназ, опосредованной ITAM-содержащим FcγR, таким образом предотвращая приток внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Перекрестное сшивание FcγRIII ингибирует активирующий ответ на лигирование FcγR, что, в свою очередь, ингибирует активацию, пролиферацию В-клеток и секрецию ими антител.

Fc-эпсилон-рецепторы (FcεR) встречаются на поверхности тучных клеток и базофилов, а также на эозинофилах, моноцитах, макрофагах и тромбоцитах у людей. Существует два типа Fcε-рецепторов: FcεRI (Fcε-рецептор I типа), высокоаффинный рецептор IgE, и FcεRII (Fcε-рецептор II типа), также известный как CD23, низкоаффинный рецептор IgE. IgE может увеличивать экспрессию обоих типов Fcε-рецепторов.

Имуноглобулин E (IgE) представляет собой класс антител (или "изотип" иммуноглобулинов (Ig)), который был обнаружен только у млекопитающих. IgE существует в виде мономеров, содержащих две тяжелые цепи (ε-цепи) и две легкие цепи, при этом ε-цепь содержит 4 Ig-подобных константных домена (Cε1-Cε4). IgE также играет важную роль в реакциях гиперчувствительности I типа (Gould H. et al. (2003), *Annu. Rev. Immunol.* 21: 579-628), которые проявляются при различных аллергических заболеваниях, таких как аллергическая астма, большинство типов синусита, аллергический ринит, пищевая аллергия и некоторые типы хронической крапивницы и атопического дерматита. IgE также играет основную роль при аллергических состояниях, таких как анафилактические реакции на определенные лекарственные средства, пчелиные укусы и антигенные препараты, применяемые при специфической десенсибилизирующей иммунотерапии.

IgE запускает IgE-опосредованную аллергическую реакцию путем связывания с FcεR, встречающимися на поверхности тучных клеток и базофилов. Связывание антигенов с IgE, уже связанным с FcεRI на тучных клетках, приводит к перекрестному сшиванию связанного IgE и агрегации нижерасположенного FcεRI, что приводит к дегрануляции и высвобождению медиаторов из клеток. Базофилы при перекрестном сшивании IgE на их поверхности антигенами высвобождают питокины 2 типа, такие как интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-13 (IL-13), и другие провоспалительные медиаторы. Низкоаффинный рецептор (FcεRII) всегда экспрессируется на В-клетках, но его экспрессия может быть индуцирована с помощью IL-4 на поверхностях макрофагов, эозинофилов, тромбоцитов и некоторых Т-клеток.

Тучные клетки и базофилы являются важными иммунорегулирующими клетками и центральными эффекторными клетками в IgE-зависимых аллергических реакциях и во многих других острых или хронических воспалительных процессах. Данные типы клеток имеют рецепторы как IgG, так и IgE. Активация высокоаффинного рецептора IgE (Fc-эпсилон RI) на участвующих в аллергических реакциях эффекторных клетках, таких как тучные клетки и базофилы, индуцирует множество положительных сигналов посредством иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM), что приводит к быстрому проявлению аллергических воспалительных реакций. В противовес этому, коагрегация рецептора IgG Fc-гамма RIII опосредует ингибирующие сигналы посредством иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITIM).

Успехи в положительной и отрицательной регуляции экспрессии Fc-рецептора и передачи сигналов

через них пролили свет на роль Fc-рецепторов в иммунной системе, указывая на то, что они являются бифункциональными, ингибирующими и активирующими структурами. На основе этих полученных сведений были разработаны новые терапевтические стратегии, такие как применение химерных белков слияния, которые одновременно активируют Fc-эпсилон RI и Fc-гамма RIIb. В этих новых подходах используют преимущество двухвалентной природы Fc-рецепторов и создают почву для инновационных стратегий модулирования аллергических иммунных реакций. Пример такого химерного белка слияния раскрыт в WO 2002/088317.

Однако, несмотря на тот факт, что из уровня техники известно еще больше таких химерных белков слияния, см. также WO 2006/028956, тем не менее, весьма желательно предложить улучшенные химерные белки слияния, которые проявляют по меньшей мере две функции - во-первых, связывание с Fc-эпсилон-рецептором, и во-вторых, связывание с Fc-гамма-рецептором IIb, обеспечивая таким образом коагрегацию обоих рецепторов.

Настоящее раскрытие удовлетворяет данную потребность, предлагая антитела, описанные ниже в данном документе, охарактеризованные в формуле изобретения и проиллюстрированные прилагаемыми примерами и чертежами.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с помощью первого связывающего домена с Fcε-рецептором I типа (FcεRI) и с помощью второго связывающего домена с Fc-гамма-рецептором IIb (FcγRIIb),

причем первый связывающий домен содержит константные Cε3- и Cε4-домены IgE,

причем второй связывающий домен представляет собой Fab-домен,

которое содержит в своем втором связывающем домене в своей вариательной области тяжелой и легкой цепей следующие последовательности CDR:

а) SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3) в своей вариательной области тяжелой цепи и SEQ ID NO: 17 (CDR-L1), SEQ ID NO: 18 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 19 (CDR-L3) в своей вариательной области легкой цепи или

(b) SEQ ID NO: 20 (CDR-H1), SEQ ID NO: 21 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 22 (CDR-H3) в своей вариательной области тяжелой цепи и SEQ ID NO: 23 (CDR-L1), SEQ ID NO: 24 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 25 (CDR-L3) в своей вариательной области легкой цепи.

Согласно одному варианту осуществления представлено антитело, которое является химерным или гуманизированным.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 3, по меньшей мере с одной из мутаций, выбранных из группы, включающей замену аминокислоты Q в положении 1 на E, замену аминокислоты V в положении 11 на L, замену аминокислоты G в положении 42 на K, замену аминокислоты S в положении 50 на V, замену аминокислоты Y в положении 53 на S, замену аминокислоты K в положении 58 на T, замену аминокислоты G в положении 61 на A, замену аминокислоты S в положении 75 на T, замену аминокислоты K в положении 76 на R, замену аминокислоты N в положении 77 на S и замену аминокислоты T в положении 78 на N.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 4, по меньшей мере с одной из мутаций, выбранных из группы, включающей замену аминокислоты Q в положении 1 на N, замену аминокислоты S в положении 28 на N, замену аминокислоты S в положении 31 на T, замену аминокислоты V в положении 33 на L, замену аминокислоты D в положении 34 на A, замену аминокислоты Y в положении 49 на F, замену аминокислоты T в положении 53 на N, замену аминокислоты Y в положении 55 на A, замену аминокислоты L в положении 89 на Q и замену аминокислоты N в положении 93 на Y.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где указанное антитело повышает уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIb в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где второй связывающий домен имеет в своей вариательной области тяжелой цепи аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1 или 3, и/или в своей вариательной области легкой цепи аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 4.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где первый связывающий домен имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или 36.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, которое является гликозилированным или дегликозилированным.

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где антитело связывается *in vitro* с FcγRIIb человека с аффинностью, характеризующейся константой скорости диссоциации, составляющей по меньшей мере  $4,9 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ .

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, где антитело связывается *in vi-*

то с FcεRI человека с аффинностью, характеризующейся значением Kd по меньшей мере  $1,2 \times 10^{-7}$  (M).

Согласно другому варианту осуществления представлено антитело, которое специфично связывается с эпитопом FcγRIIB человека, содержащим аминокислоты положений 20-40 согласно SEQ ID NO: 5.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к вектору, содержащему по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, встроенную в указанный вектор.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансфицированной последовательностью нуклеиновой кислоты или вектором согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или профилактики аллергии на пыльцу, содержащей в качестве активного ингредиента антитело, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики аллергии на пыльцу.

Зная, что агрегация рецептора IgE с рецептором IgG (FcγRIIB) на базофилах или тучных клетках ингибирует индуцированную аллергеном дегрануляцию клеток (Daeron (1997), *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113, 138-141), авторы настоящего изобретения предлагают антитела, которые, если так можно выразиться, не только обеспечивают перекрестное сшивание или коагрегацию этих двух рецепторов с целью ингибирования IgE-опосредованной активации тучных клеток и базофилов, но также усиливают функцию отрицательной регуляции Fc-гамма RIIB с целью улучшения лечения заболеваний, ассоциированных с базофилами и/или тучными клетками, таких как аллергические заболевания. Как описано в данном документе выше, активация высокоаффинного рецептора IgE (Fc-эпсилон RI) на участвующих в аллергических реакциях эффекторных клетках, таких как тучные клетки и базофилы, приводит к быстрому проявлению аллергических воспалительных реакций. В противовес этому, коагрегация рецептора IgG Fc-гамма RIIB опосредует ингибирующие сигналы посредством иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITIM). Авторы настоящего изобретения таким образом предположили, не ограничиваясь какой-либо теорией, что усиление/закрепление известного фосфорилирования ITIM Fc-гамма RIIB под воздействием коагрегации рецепторов Fc-гамма RIIB и Fc-эпсилон (см. Zhu et al. (2002), *Nat. Med.* 8(5), 518-521) может быть благоприятным для противодействия активирующей функции Fc-эпсилон-рецептора или даже превосходства над ней при связывании с IgE, которое приводит к высвобождению предварительно образованных медиаторов и к синтезу позднейдействующих лейкотриенов и хемокинов, все из которых вносят вклад, например, в развитие аллергического заболевания.

Имея эту цель в виду, авторы настоящего изобретения, к своему удивлению, наблюдали, что антитела, предложенные в настоящем раскрытии, существенно повышали уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIB и, таким образом, по-видимому, усиливали ингибирующий сигнал, который уже был получен посредством коагрегации рецепторов Fc-гамма RIIB и Fc-эпсилон, так что он оптимально превосходил активирующий сигнал, запускаемый активацией Fc-эпсилон-рецептора при связывании с IgE. Таким образом, антитела, раскрытые в данном документе, обеспечивают две преимущественные функции - они перекрестно сшивают Fc-гамма RIIB и Fc-эпсилон R, что приводит к фосфорилированию ITIM и, таким образом, к ингибированию передачи сигналов через Fc-эпсилон R, а также они усиливают собственно фосфорилирование ITIM Fc-гамма RIIB посредством их связывания с указанным рецептором, что опять-таки ингибирует передачу сигналов через Fc-эпсилон-рецептор в базофилах и тучных клетках. Таким образом, существует двойной эффект, проявляемый антителами по настоящему раскрытию, в отношении ингибирующей роли опосредованной Fc-гамма RIIB передачи сигналов в клетках, которые массово вносят вклад в развитие заболевания, ассоциированного с тучными клетками и/или базофилами. Для получения преимущества от этой опосредованной Fc-гамма RIIB передачи ингибирующих сигналов в базофилах и тучных клетках авторы настоящего изобретения предлагают антитела по настоящему раскрытию, которые в сравнении, например, с известными из уровня техники антителами, направленными на Fc-гамма RIIB, неожиданно продемонстрировали значительно более сильный эффект в отношении фосфорилирования ITIM, что не могло ожидать. Такой более сильный эффект является преимущественным, так как он способствует передаче ингибирующих сигналов в тучных клетках и/или базофилах таким образом, чтобы ингибировать IgE-опосредованную активацию тучных клеток и базофилов, оба из которых типов клеток играют главную роль в возникновении и проявлении, например, аллергических заболеваний.

Как может быть видно из фиг. 30, антитело на основе IgE, связывающееся с Fc-гамма-рецептором RIIB, раскрытое в данном документе, в действительности способно уменьшить число активированных эозинофилов после их активации пыльцой (55,1%) до уровня, который соответствует необработанным эозинофилам (10,6% по сравнению с 9,5% необработанных эозинофилов). Это показывает активность такого антитела в отрицательной регуляции количества клеток, вовлеченных, например, в развитие аллергических заболеваний, после того как эти клетки были активированы аллергеном путем связывания с дан-

ным аллергеном IgE, а его Fc-домена с Fc-эпсилон-рецептором. Эозинофилы наряду с тучными клетками и/или базофилами вовлечены в развитие аллергических заболеваний. Соответственно предположение авторов настоящего изобретения, которое заключается в том, что усиление/закрепление известного фосфорилирования ITM Fc-гамма R1IB под воздействием коагрегации рецепторов Fc-гамма R1IB и Fc-эпсилон (см. Zhu et al. (2002), Nat. Med. 8(5), 518-521) может быть благоприятным для противодействия активирующей функции Fc-эпсилон-рецептора при связывании с IgE или даже превосходства над ней, по-видимому, действительно будет перспективным в борьбе, например, с аллергическими заболеваниями.

Исходя из известных из уровня техники антител, связывающихся с Fc-гамма R1IB, в частности антител, таких как антитела, раскрытые в данном документе, преимущественные свойства полипептидов нельзя было ни ожидать, ни предугадать, не говоря уже о том, что было возможно оправданное ожидание успеха их получения, в частности CDR или переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антител, охарактеризованных в данном документе. В дополнение к этому улучшенному свойству, антитела, описанные в данном документе, также характеризуются преимущественной высокой специфичностью в отношении FcγR1IB человека и/или являются неблокирующими, т.е. их связывание с Fc-рецептором посредством их переменной(переменных) области(областей) не препятствует связыванию иммунных комплексов (IC) или агрегированного IgG с клетками.

Преимущественно антитело, раскрытое в данном документе, связывается по цис-типу с клеткой, экспрессирующей Fc-эпсилон-рецептор (FcεR) и Fc-гамма-рецептор R1B (FcγR1IB), т.е. указанное антитело связывается с FcεR и FcγR1IB на одной и той же клетке, где такая клетка экспрессирует FcεR и FcγR1IB. Данное свойство антитела можно легко протестировать в соответствии с тестом активации базофилов, описанным в примере 5, за исключением того, что к гепаринизированной цельной крови не добавляют антиген. Вкратце, гепаринизированную цельную кровь приводят в контакт с антителом, раскрытым в данном документе. Затем цельную кровь инкубируют с детекторным антителом, связывающимся с молекулой CD63 на базофильных клетках в цельной крови, где детекторное антитело характеризуется наличием выявляемой метки, например флуоресцентной метки, и число клеток, экспрессирующих CD63 на уровне выше порогового, измеряют с помощью, например, методики FACS (сортировки клеток с активированной флуоресценцией). Пороговый уровень может быть определен по гепаринизированной цельной крови, которая не контактировала с указанным антителом (что соответствует контролю). Если клетки не экспрессируют CD63 на уровне выше порогового, антитело связывается предпочтительно по цис-типу, тогда как экспрессия CD63 на уровне выше порогового указывает на то, что антитело связывается с клетками по транс-типу, т.е. антитело связывается с FcεR на первой клетке и с FcγR1IB на второй клетке или с FcγR1IB на первой клетке и с FcεR на второй клетке. Однако, как было сказано, в контексте настоящего раскрытия антитела, связывающиеся по цис-типу, являются предпочтительными.

Соответственно в настоящем раскрытии предлагаются антитела, связывающиеся с помощью первого связывающего домена с Fc-эпсилон-рецептором (FcεR) и с помощью второго связывающего домена с Fc-гамма-рецептором R1B (FcγR1IB).

Полагают, что антитела по настоящему раскрытию конкурируют с собственными патогенными антителами IgE организма за связывание с Fc-эпсилон-рецептором R1 (FcεR1) посредством их Fc-части и одновременно обеспечивают совместное перекрестное сшивание FcεR1 с FcγR1IB. Полагают, что данный механизм действия предотвращает высвобождение медиаторов из тучных клеток и/или базофилов независимо от специфичности связанного IgE к аллергену. Данный механизм был охарактеризован авторами настоящего изобретения, например, посредством применения FcεR1-экспрессирующих базофилов от страдающих атопией доноров (т.е. доноров с предрасположенностью к развитию иммунных реакций гиперчувствительности в ответ на аллергены). Сенсибилизированные аллергеном базофилы вышеупомянутых страдающих атопией доноров, обработанные антителом, раскрытым в данном документе, характеризовались значительно сниженной активацией по сравнению с контролем, как показано в прилагаемых примерах.

"Антитело", как используется в данном документе, представляет собой полипептид, который содержит один или более связывающих доменов, где первый связывающий домен связывается с Fc-эпсилон-рецептором (FcεR), а второй связывающий домен связывается с Fc-гамма-рецептором R1B (FcγR1IB). Антитело обеспечивает остов для указанных одного или более связывающих доменов, так, чтобы указанные связывающие домены могли связываться/взаимодействовать с указанной структурой/антигеном/эпитопом-мишенью. Например, такой остов может обеспечиваться белком A, в частности его Z-доменом (аффителами), ImmE7 (иммунными белками), BPTI/APPI (доменами Куница), Ras-связывающим белком AF-6 (PDZ-доменами), хариботоксином (токсином скорпиона), CTLA-4, Min-23 (ноттинсами), липокалинами (антикалинами), неокарциностатином, доменом фибронектина, доменом с консенсусными анкириновыми повторами или тиоредоксином (Skerra, Curr. Opin. Biotechnol. 18, 295-304 (2005); Hosse et al., Protein Sci. 15, 14-27 (2006); Nicaise et al., Protein Sci. 13, 1882-1891 (2004); Nygren and Uhlen, Curr. Opin. Struc. Biol. 7, 463-469 (1997)). Связывающие домены антитела по настоящему изобретению могут быть соединены посредством линкера. Линкер может представлять собой пептидный лин-

кер. Линкер может содержать (или состоять из) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот. Предпочтительными примерами пептидных линкеров являются  $(G_4S)_n$ , где  $n$  является целым числом в диапазоне от 1 до 5;  $(AP)_2$ ;  $(AP)_4$ ;  $(AP)_{5-7}$ .

Термин "связывающий домен" применительно к настоящему раскрытию характеризует домен, который способен к специфичному связыванию/взаимодействию с указанным эпитопом-мишенью или указанным участком-мишенью на его молекулах-мишенях  $Fc\epsilon R$  и  $Fc\gamma RIIb$  соответственно. Связывающие домены могут быть получены из донора связывающего домена, как, например, из антитела или из любого вышеупомянутого остова.

Термин "связывающий домен" при использовании в данном документе охватывает то, что связывающий домен может активно связываться с мишенью или может пассивно быть связан, например, рецептором. Соответственно связывающий домен применительно к раскрытым в настоящем изобретении антителам может являться лигандом рецептора, такого как  $Fc$ -рецептор.

Предпочтительный связывающий домен антитела представляет собой по меньшей мере часть Fab-домена. "Fab-домен", используемый в данном документе, охватывает (а) варибельную(варибельные) область(области) тяжелой и/или легкой цепей и/или CDR и/или (b) каркасный(каркасные) участок(участки) варибельной области тяжелой и/или легкой цепей. Таким образом, в связывающем домене, описанном в данном документе, предпочтительно содержатся (а) варибельная(варибельные) область(области), как, например, варибельная область тяжелой и/или легкой цепей, или CDR и/или (b) каркасный(каркасные) участок(участки) варибельной области тяжелой и/или легкой цепей. Таким образом, антитело предпочтительно содержит в качестве первого и второго связывающего домена Fab-домен, предпочтительно (а) варибельную(варибельные) область(области), как, например, варибельную область тяжелой и/или легкой цепей, или CDR и/или (b) каркасный(каркасные) участок(участки) варибельной области тяжелой и/или легкой цепей.

Другой упоминаемый связывающий домен антитела представляет собой константную область (или домен) ( $Fc$ -домен) антитела IgG или IgE или его часть. "Часть"  $Fc$ -домена при использовании в данном документе предпочтительно имеет такую длину, что она связывается со своим когнатным  $Fc$ -рецептором, таким как  $Fc$ -эпсилон-рецептор или  $Fc$ -гамма-рецептор IIb.

Антитело по настоящему раскрытию также предпочтительно содержит в качестве первого связывающего домена Fab-домен, предпочтительно варибельную область, такую как варибельная область тяжелой и/или легкой цепей, или CDR и/или каркасные участки варибельной области тяжелой и/или легкой цепей, который связывается с  $Fc$ -эпсилон-рецептором, и в качестве второго связывающего домена  $Fc$ -домен IgG или его часть, связывающиеся с  $Fc$ -гамма-рецептором IIb.

Антитело по настоящему раскрытию более предпочтительно содержит в качестве первого связывающего домена  $Fc$ -домен IgE или его часть, связывающиеся с  $Fc$ -эпсилон-рецептором, и в качестве второго связывающего домена Fab-домен, предпочтительно варибельную область, такую как варибельная область тяжелой и/или легкой цепей, или CDR и/или каркасные участки варибельной области тяжелой и/или легкой цепей, который связывается с  $Fc$ -гамма-рецептором IIb.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым специфично связывается связывающий домен. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому эпитоп иногда также в данном документе называют термином "антигенная структура" или "антигенная детерминанта". Таким образом, связывающий домен является "участком взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимают как определяющее "специфичное распознавание". Предпочтительный эпитоп применительно к настоящему изобретению расположен в  $Fc$ -эпсилон-рецепторе и  $Fc$ -гамма-рецепторе IIb соответственно. Такой эпитоп предпочтительно расположен во внеклеточной части любого из этих двух  $Fc$ -рецепторов.

"Эпитопы" могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, расположенными рядом друг с другом благодаря сворачиванию белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность содержит распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 и в более обычном случае по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например от приблизительно 8 до приблизительно 10, аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот, содержащая эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознаваемого эпитопа (например, эпитопа, в котором первичная последовательность аминокислот необязательно распознается связывающим доменом). Обычно конформационный эпитоп содержит большее число аминокислот по сравнению с линейным эпитопом. Что касается распознавания конформационных эпитопов, связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептида или белка или его фрагмента. Например, при сворачивании молекулы белка с образованием трехмерной структуры определенные аминокислоты и/или полипептидный каркас, образующие конформационный эпитоп, располагаются рядом друг с другом, позволяя антителу распознавать трехмерный эпитоп, присутствующий только в трехмерной структуре. Способы определения конформации эпитопов включают без ограничения рентгеновскую кристаллографию, двухмерную спектроскопию

ядерного магнитного резонанса (2D-NMR), а также сайт-направленное спин-мечение и спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (EPR).

Связывающий домен антитела по настоящему изобретению преимущественно специфично связывается с FcεR и FcγRIIB соответственно. Термины "(способен к) связыванию с", "специфично распознающий", "направленный на" и "вступает в реакцию с" в соответствии с настоящим изобретением означают, что связывающий домен способен к специфичному взаимодействию с одной или более, как, например, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя или по меньшей мере четырьмя, аминокислотами эпитопа.

Термин "Fc-гамма-рецептор IIВ" используется в данном документе взаимозаменяемо с терминами "FcγRIIB", или "Fc-гамма-рецептор IIВ", или "Fcγ-рецептор IIВ", или "FcγRIIB" и включает как мембранный FcγRIIB, так и растворимый FcγRIIB (т.е. внеклеточную часть Fcγ-рецептора IIВ). Указанный термин также включает варианты FcγRIIB, такие как FcγRIIB1 и FcγRIIB2, которые отличаются друг от друга вставкой последовательности из 19 аминокислот в цитоплазматическом домене FcγRIIB1. Другой вариант, охватываемый указанным термином, представляет собой FcγRIIB3, который является идентичным FcγRIIB2, но о котором отсутствует информация в отношении предполагаемого участка расщепления сигнальной пептидазой.

Иногда в данном документе FcγRIIB также называют "CD32В". Таким образом, этот термин, а также другие термины, используемые для обозначения Fc-гамма-рецептора IIВ, описанного выше, можно использовать взаимозаменяемо с термином "CD32В". Fc-гамма-рецептор IIВ относится к белкам суперсемейства иммуноглобулинов и встречается на многих клетках ростков кроветворения. Как указывает его название, Fc-рецептор IIВ распознает Fc-часть (кристаллизуемый фрагмент) антител, т.е. фрагмент, который соответствует двум C-концевым доменам обеих тяжелых цепей антитела и, как правило, взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками, и связывается с ней. Предпочтительный FcγRIIB приведен под SEQ ID NO: 5. Предпочтительный растворимый FcγRIIB приведен под SEQ ID NO: 12.

"Растворимый FcγRIIB" также обозначают как "sFcγRIIB". Используемый в данном документе термин "растворимый Fcγ-рецептор IIВ" и аналогичные термины относятся к внеклеточной части Fcγ-рецептора IIВ. Такая часть может растворяться в жидкости. Как правило, растворимые формы любого класса, изоформы или аллеля FcγR можно идентифицировать по предшествующей "s", например sCD32 или sFcγRII относится к растворимому Fc-гамма-рецептору RII. Как правило, в отличие от мембранного (т.е. мембраносвязанного) FcγR, растворимый FcγR не содержит трансмембранную область или внутрицитоплазматический "хвост".

Раскрытый FcγRIIB предпочтительно имеет человеческое происхождение или представляет собой FcγRIIB человека. Термин "человеческое происхождение" следует истолковывать в его наиболее широком смысле. В целом он означает, что FcγR (или его область или фрагмент) имеет сходство или подобие с FcγR человека (т.е. с белком, обнаруживаемом в организме человека) по аминокислотной последовательности и/или структуре.

В качестве альтернативы FcγRIIB "человеческого происхождения" может представлять собой рекомбинантный FcγRIIB, полученный путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, например, как описано у Sondermann and Jacob (1999), *Biol. Chem.* 380(6), 717-721. Вкратце, представляющий интерес ген получают из организма и встраивают в вектор, например плазмиду или вирус, который затем используют для переноса гена в клетку-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный ген и вырабатывающую рекомбинантный белковый продукт. Специалист в данной области без труда поймет, какую клетку-хозяина выбрать для того, чтобы получить FcγRIIB, который, например, является подходящим для получения фармацевтической композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть желательным негликозилированный FcγRIIB. Затем специалист в данной области может выбрать прокариотическую клетку-хозяина для экспрессии FcγRIIB, лишённую ферментного аппарата, необходимого для гликозилирования белка. В одном варианте осуществления FcγRIIB можно экспрессировать у прокариот, а затем подвергнуть очистке и рефолдингу в соответствии с описанием WO 00/32767.

В другом варианте осуществления FcγRIIB можно также получать в эукариотических системах экспрессии. Подходящие системы включают эукариот со специализированным аппаратом для выработки внеклеточных белков, например с В-клетками. Другие возможные эукариотические системы экспрессии включают без ограничения клетки CHO или НЕК. Таким образом, указанный растворимый FcγRIIB представляет собой рекомбинантный, растворимый и гликозилированный FcγRIIB.

FcγRIIB, упоминаемый в данном документе, дополнительно охватывает FcγRIIB, который по сравнению с FcγR дикого типа был модифицирован или изменен в отношении аминокислотной последовательности и содержит, например, дополнительные участки гликозилирования и т.п. Однако, предусматриваются также негликозилированные формы FcγRIIB, и они представляют собой применимый вариант осуществления FcγRIIB.

Для целей настоящего раскрытия FcεR включает как FcεRI, так и FcεRII. В данном документе также используются такие термины, как "Fc-эпсилон R" или "Fc-эпсилон-рецептор", все из которых обозначают рецептор, связывающийся с константной областью IgE или ее частью. Все данные термины, таким образом, могут использоваться взаимозаменяемо.

Предпочтительные первый и второй связывающие домены антитела по настоящему раскрытию получены из антитела, предпочтительно указанный первый и/или второй связывающий домен является частью антитела, такой как Fab-домен(домены), переменная(переменные) область(области) тяжелой и/или легкой цепей или CDR и/или каркасные участки переменной области тяжелой и/или легкой цепей антитела.

В качестве альтернативы связывающий домен применительно к раскрытым в настоящем изобретении антителам предпочтительно может представлять собой константную область (константный домен) или по меньшей мере ее часть, связывающиеся с Fc-рецептором, таким как Fc-эпсилон-рецептор или Fc-гамма-рецептор IIb. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления как первый, так и второй связывающий домен может представлять собой константную область антитела или по меньшей мере ее часть, такую как Fc-область IgG или Fc-область IgE, связывающиеся с Fc-рецептором, таким как Fc-эпсилон-рецептор или Fc-гамма-рецептор. Соответственно, первый связывающий домен предпочтительно может представлять собой Fc-область IgE или ее часть, связывающиеся с Fc-эпсилон-рецептором. Второй связывающий домен предпочтительно может представлять собой Fc-область IgG или ее часть, связывающиеся с Fc-гамма-рецептором RII.

В качестве альтернативы первый связывающий домен предпочтительно может представлять собой по меньшей мере часть антитела, которое связывается с Fc-эпсилон-рецептором, и второй связывающий домен может представлять собой по меньшей мере часть константной области IgG или ее части, связывающихся с Fc-гамма-рецептором IIb. Антитело, раскрытое в данном документе имеет переменные домены и константную область.

Аналогично, первый домен предпочтительно может представлять собой по меньшей мере часть константной области IgE или ее части, связывающихся с Fc-эпсилон-рецептором, и второй домен может представлять собой по меньшей мере часть антитела, которое связывается с Fc-гамма-рецептором IIb. Антитело, раскрытое в данном документе, имеет переменные домены и константную область, такую как Fc-область IgE.

В случае, когда второй связывающий домен (связывающийся с Fc-гамма-рецептором IIb) антитела, описанного в данном документе, представляет собой часть Fab-домена, он предпочтительно содержит в своей переменной области тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 29, 30 и 31, а в своей переменной области легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 32, 33 и 34, где антитело, имеющее второй связывающий домен, определенный выше, повышает уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIb в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Из фиг. 7 видно, что антитела GB3 (см. WO 2005/051999) и 2B6 (см. WO 2004/016750), известные из уровня техники, неспособны повышать уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIb так, как его может повышать антитело, раскрытое в данном документе, такое как 8A6, в виде химерного либо гуманизованного антитела 8A6. Таким образом, соответственно способность или неспособность к повышению уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIb, по-видимому, зависит от CDR, в частности от некоторых ключевых аминокислотных остатков, которые присутствуют в 8A6, но не в GB3 и/или 2B6 соответственно. Следовательно, аминокислоты, которые присутствуют только в CDR 8A6 в положениях, аналогичных соответствующим положениям в CDR 2B6 или GB3, можно рассматривать как "ключевые остатки".

Визуальное сравнение CDR из 2B6, GB3 и 8A6 в отношении ключевых остатков выявило выгодное присутствие в H-CDR1 аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 29, в H-CDR2 аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 30, в H-CDR3 аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 31, в L-CDR1 аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 32, в L-CDR2 аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 33, и в L-CDR3 аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 34.

Различия между аминокислотными последовательностями CDR 8A6, GB3 и 2B6 можно также выразить в виде степени идентичности (в % идентичности), которая допускается в CDR антитела, раскрытого в данном документе, при использовании CDR 8A6 в качестве эталонных последовательностей.

Соответственно H-CDR1 второго связывающего домена по настоящему изобретению предпочтительно характеризуется идентичностью 60% или более, как, например, 70, 80 или 90%, с H-CDR1, которая приведена под SEQ ID NO: 20.

В определенных вариантах осуществления H-CDR2 второго связывающего домена, раскрытого в данном документе, характеризуется идентичностью 36% или более, как, например, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%, с H-CDR2, которая приведена под SEQ ID NO: 21.

В определенных вариантах осуществления H-CDR3 второго связывающего домена, раскрытого в данном документе, характеризуется идентичностью 50% или более, как, например, 60, 70, 80 или 90%, с



H-CDR3, которая приведена под SEQ ID NO: 22.

В определенных вариантах осуществления L-CDR1 второго связывающего домена, раскрытого в данном документе, характеризуется идентичностью 64% или более, как, например, 70, 80 или 90%, с L-CDR1, которая приведена под SEQ ID NO:23.

В определенных вариантах осуществления L-CDR2 второго связывающего домена, раскрытого в данном документе, характеризуется идентичностью 29% или более, как, например, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%, с L-CDR2, которая приведена под SEQ ID NO: 24.

В определенных вариантах осуществления L-CDR3 второго связывающего домена, раскрытого в данном документе, характеризуется идентичностью 78% или более, как, например, 80 или 90%, с L-CDR3, которая приведена под SEQ ID NO: 25.

Соответственно в настоящем раскрытии в определенных вариантах осуществления предложено антитело, имеющее второй связывающий домен (связывающийся с Fc-гамма-рецептором IIb), которое содержит в своей вариабельной области тяжелой цепи последовательность H-CDR1, которая на 60% или более идентична последовательности H-CDR1, приведенной под SEQ ID NO: 20, последовательность H-CDR2, которая на 36% или более идентична последовательности H-CDR2, приведенной под SEQ ID NO: 21, последовательность H-CDR3, которая на 50% или более идентична последовательности H-CDR3, приведенной под SEQ ID NO: 22, последовательность L-CDR1, которая на 64% или более идентична последовательности L-CDR1, приведенной под SEQ ID NO: 23, последовательность L-CDR2, которая на 29% или более идентична последовательности L-CDR2, приведенной под SEQ ID NO: 24, и последовательность L-CDR3, которая на 78% или более идентична последовательности L-CDR3, приведенной под SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления распознающая молекула, такая как антитело, кроме того, содержит в CDR ее второго связывающего домена в вариабельной области тяжелой и легкой цепей "ключевые остатки", определенные под SEQ ID NO: 29, 30, 31 (H-CDR) и определенные под SEQ ID NO: 32, 33 и 34 (L-CDR).

Антитело с таким вторым связывающим доменом повышает уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIb в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Используемый в данном документе термин "% идентичность" относится к процентной доле идентичных аминокислотных остатков в соответствующем положении в последовательности при сравнении двух аминокислотных последовательностей с использованием оптимального выравнивания последовательностей, которое проиллюстрировано на примере методик ClustalW или X, доступных по адресу [www.clustal.org](http://www.clustal.org), или эквивалентных методик. Например, в случае выравниваний CDR каждая из CDR (из вариабельной области тяжелой и легкой цепей соответственно), приведенных под SEQ ID NO: 20-25, служит в качестве эталонной последовательности для представляющей интерес последовательности CDR вариабельной области тяжелой или легкой цепи соответственно, например H-CDR1 под SEQ ID NO: 20 выравнивают с представляющим интерес H-CDR1. Соответственно выравнивают обе последовательности (эталонную последовательность и представляющую интерес последовательность), идентифицируют идентичные аминокислотные остатки у обеих последовательностей, и общее количество идентичных аминокислот делят на общее количество аминокислот (длину в аминокислотах) SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24 или 25 соответственно в зависимости от того, выравнивают ли H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 или L-CDR3. Результат этого деления представляет собой процентное значение, т.е. процентное значение/степень идентичности.

Такую же процедуру с соответствующими изменениями применяли для сравнения двух вариабельных областей в отношении их степени идентичности.

Последовательности H-CDR1, приведенные под SEQ ID NO: 14 и 20, являются иллюстративными видами последовательностей H-CDR1, приведенной под SEQ ID NO: 29.

Последовательности H-CDR2, приведенные под SEQ ID NO: 15 и 21, являются иллюстративными видами последовательностей H-CDR2, приведенной под SEQ ID NO: 30.

Последовательности H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 16 и 22, являются иллюстративными видами последовательностей H-CDR3, приведенной под SEQ ID NO: 31.

Последовательности L-CDR1, приведенные под SEQ ID NO: 17 и 23, являются иллюстративными видами последовательностей L-CDR1, приведенной под SEQ ID NO: 32.

Последовательности L-CDR2, приведенные под SEQ ID NO: 18 и 24, являются иллюстративными видами последовательностей L-CDR2, приведенной под SEQ ID NO: 33.

Последовательности L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 19 и 25, являются иллюстративными видами последовательностей L-CDR3, приведенной под SEQ ID NO:34.

Соответственно в данном документе предложено антитело со вторым связывающим доменом (связывающимся с Fc-гамма-рецептором IIb), которое:

(а) содержит в своей вариабельной области тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 14, 15 и 16, а в своей вариабельной области легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 17, 18 и 19; или

(b) содержит в своей вариабельной области тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 20, 21 и 22, а в своей вариабельной области легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 23, 24 и 25,

где указанное антитело предпочтительно повышает уровень фосфорилирования ITIM Fc $\gamma$ RIIB в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Антитело (связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIb) со вторым связывающим доменом, содержащее в своей вариабельной области тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 14, 15 и 16, а в своей вариабельной области легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 17, 18 и 19, или содержащее в своей вариабельной области тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 20, 21 и 22, а в своей вариабельной области легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO: 23, 24 и 25, представляет собой иллюстративное антитело. Такое иллюстративное антитело предпочтительно повышает уровень фосфорилирования ITIM Fc $\gamma$ RIIB в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

В одном варианте осуществления антитело (связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIb) имеет второй связывающий домен, который содержит, по меньшей мере, (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 65% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.

Кроме того, антитело (связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIb) может иметь второй связывающий домен, который содержит по меньшей мере одну из (i) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, и (ii) вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

Такие антитела повышают уровень фосфорилирования ITIM Fc $\gamma$ RIIB в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Предпочтительным антителом является антитело, которое связывается с помощью первого связывающего домена, который является по меньшей мере частью Fab-домена, с Fc-эпсилон-рецептором и с помощью второго связывающего домена, который представляет собой константную область IgG или ее часть, связывающиеся с Fc-гамма-рецептором IIb, с Fc-гамма-рецептором IIb, т.е. антитело, связывающееся с Fc $\gamma$ R, предпочтительно типа IgG.

Другое иллюстративное антитело связывается с помощью первого связывающего домена, который является по меньшей мере частью Fab-домена, с Fc-эпсилон-рецептором и с помощью второго связывающего домена, который является по меньшей мере частью Fab-домена, с Fc-гамма-рецептором IIb, т.е. представляет собой бифункциональное или биспецифическое антитело, связывающееся с Fc $\epsilon$ R  $\times$  антитело, связывающееся с Fc $\gamma$ RIIB. В определенных вариантах осуществления антитело не связывается с Fc-гамма-рецептором IIa (Fc $\gamma$ RIIA).

Также предусматривается антитело, которое содержит в качестве первого связывающего домена Fc-домен IgE или его часть и в качестве второго связывающего домена Fc-домен IgG или его часть.

Другим иллюстративным антителом является антитело, которое связывается с помощью первого связывающего домена, который является константной областью IgE или ее частью, связывающимися с Fc-эпсилон-рецептором, с Fc-эпсилон-рецептором и с помощью второго связывающего домена, который является по меньшей мере частью Fab-домена, с Fc-гамма-рецептором IIb, т.е. антитело, связывающееся с Fc $\gamma$ RIIB, предпочтительно типа IgG. В определенных вариантах осуществления антитело не связывается с Fc-гамма-рецептором IIa (Fc $\gamma$ RIIA).

При использовании в данном документе термин "антитело" означает белок, содержащий один или более полипептидов (содержащих один или более связывающих доменов, предпочтительно антигенсвязывающих доменов), в значительной степени или частично кодируемых генами иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов. Термин "иммуноглобулин" (Ig) и термин "антитело" используются в данном документе взаимозаменяемо. Общеизвестные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей цепей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также бесчисленное множество генов вариабельных областей иммуноглобулинов. В частности, при использовании в данном документе термин "антитело", как правило, означает тетрамерный гликозилированный белок, состоящий из двух легких (L) цепей размером примерно 25 кДа каждая и двух тяжелых (H) цепей размером примерно 50 кДа каждая. В антителах могут встречаться два типа легких цепей, называемые лямбда и каппа. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей иммуноглобулина можно отнести к пяти основным классам: A, D, E, G и M, и некоторые из них можно дополнительно подразделить на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, причем в опре-

деленных вариантах осуществления настоящего раскрытия IgG или IgE являются предпочтительными. Антитело IgM содержит 5 основных гетеротетрамерных звеньев вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, тогда как антитела IgA содержат от 2 до 5 основных 4-цепочечных звеньев, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в комбинации с J-цепью. В случае IgG 4-цепочечное звено обычно имеет массу приблизительно 150000 дальтон. Каждая легкая цепь содержит N-концевой вариабельный (V) домен (VL) и константный (C) домен (CL). Каждая тяжелая цепь содержит N-концевой V-домен (VH), три или четыре C-домена (CH) и шарнирную область.

Константные домены не вовлечены напрямую в связывание антитела с антигеном, но могут проявлять различные эффекторные функции, такие как участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Если антитело должно вызывать ADCC, оно предпочтительно относится к подтипу IgG1, тогда как подтип IgG4 не будет обладать способностью вызывать ADCC. Константный домен антитела может относиться к любому подтипу, описанному в данном документе, предпочтительно к подтипу IgE.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится не только к иммуноглобулину (или интактному антителу), но также относится к его фрагменту и охватывает любой полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий домен, такой как Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, стабилизированные дисульфидными связями Fv (sdFv) и другие фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию, как описано в данном документе. Как правило, такие фрагменты будут содержать антигенсвязывающий домен и обладать такими же свойствами, что и антитела, описанные в данном документе.

Термин "антитело" также включает без ограничения моноклональные, моноспецифические, поли- или мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, гуманизированные, камелизированные, человеческие, одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутантные, привитые и созданные *in vitro* антитела, причем химерные или гуманизированные антитела являются предпочтительными. Термином "гуманизированное антитело" обычно определяют антитело, в котором отвечающие за специфичность CDR HC и LC были перенесены на соответствующие каркасные участки вариабельных областей человека ("трансплантация CDR"). Термин "антитело" также включает scFv, одноцепочечные антитела, диатела или тетратела, доменные антитела (dAb) и нанотела. В контексте настоящего изобретения термин "антитело" также будет включать би-, три- или мультимерные или би-, три- или полифункциональные антитела с несколькими антигенсвязывающими участками, при этом предпочтительно по меньшей мере один из них является связывающим участком, специфичным к FcγRIIB.

Кроме того, используемый в данном документе термин "антитело" также относится к производным антител (в том числе к фрагментам), описанным в данном документе. "Производное" антитела содержит аминокислотную последовательность, которая была изменена путем введения замен, делеций или добавлений аминокислотных остатков. Кроме того, производное охватывает антитела, которые были модифицированы путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу или белку. Примеры таких молекул включают сахара, PEG, гидроксильные, этокси-, карбокси- или аминогруппы, но не ограничиваются ими. Ковалентные модификации антител в результате приводят к гликозилированию, пегилрованию, ацетилированию, фосфорилированию, амидированию, но не ограничиваются ими.

Антитело предпочтительно представляет собой "выделенное" антитело. Термин "выделенный" при использовании для описания антител, раскрытых в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано, отделено от компонентов среды для его получения и/или извлечено из нее. Выделенное антитело предпочтительно не связано ни с одним из других компонентов среды для его получения. Компоненты-примеси среды для получения антитела, как, например, полученные из рекомбинантных трансфицированных клеток, являются материалами, которые, как правило, препятствуют диагностическим или терапевтическим применениям полипептида, и они могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (2) до однородности посредством SDS-PAGE в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением красителя кумасси синего или предпочтительно серебряного красителя. Тем не менее, обычно выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Используемый в данном документе термин "специфично связывается" относится к антителам или их фрагментам или производным, которые специфично связываются с FcγRIIB или его фрагментом и не связываются специфично с другими Fc-рецепторами. Антитела или их фрагменты или производные связываются с FcγRIIB посредством второго связывающего домена, например, посредством вариабельного домена антитела. Однако данные антитела также могут связываться с Fc-гамма RIIB, например, посредством своего Fc-домена.

При формировании пары из VH и VL образуется один антигенсвязывающий участок. CH-домен,

наиболее проксимальный к VH, обозначается как CH1. Каждая L-цепь соединена с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи соединены друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. VH- и VL-домены содержат четыре области с относительно консервативными последовательностями, называемые каркасными участками (FR1, FR2, FR3 и FR4), которые образуют остов для трех областей с гипервариабельными последовательностями (областей, определяющих комплементарность, CDR). CDR содержат большинство остатков, ответственных за специфичные взаимодействия антитела с антигеном. CDR называются CDR1, CDR2 и CDR3. Соответственно, элементы CDR в тяжелой цепи называются H1 или H-CDR1, H2 или H-CDR2 и H3 или H-CDR3, тогда как элементы CDR в легкой цепи называются L1 или L-CDR1, L2 или L-CDR2 и L3 или L-CDR3.

Термин "вариабельный" относится к частям доменов иммуноглобулинов, которые проявляют вариабельность в своей последовательности и которые вовлечены в определение специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. к "вариабельному(вариабельным) домену (доменам)"). Вариабельность не распределена равномерно среди всех вариабельных доменов антител; она сконцентрирована в гипервариабельных субдоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Эти гипервариабельные субдомены называются "областями, определяющими комплементарность" (CDR), из которых три определяют характер связывания вариабельной области легкой цепи (L1-CDR1, L2-CDR и L3-CDR) и три определяют характер связывания вариабельной области тяжелой цепи (H1-CDR, H2-CDR и H3-CDR). CDR вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела и разделены аминокислотными последовательностями, которые содержат остовные или каркасные участки. Точные определяющие границы и длины CDR зависят от различных систем классификации и нумерации. Ввиду этого CDR могут обозначаться с использованием определений границ по Kabat, Chothia, контактными остатками или любых других определений, в том числе с помощью системы нумерации, описанной в данном документе. Несмотря на отличающиеся границы, каждая из данных систем характеризуется некоторой степенью перекрытия в той части, которая составляет так называемые "гипервариабельные области" в вариабельных последовательностях. CDR, определяемые в соответствии с этими системами, следовательно, могут отличаться по длине и граничным зонам относительно прилежащего каркасного участка; см., например, Kabat, Chothia и/или MacCallum et al., (Kabat et al., в приводившей выше цитате; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901 и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Тем не менее, нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Иллюстративные вариабельные области второго домена (связывающегося с Fc-гамма-рецептором IIВ) антитела приведены под SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4.

Термин "каркасный участок" относится к известным из уровня техники частям вариабельной области антитела, которые присутствуют между более дивергентными (т.е. гипервариабельными) CDR. Такие каркасные участки, как правило, называются каркасными участками 1-4 (FR1, FR2, FR3 и FR4) и обеспечивают остов для представления шести CDR (трех из тяжелой цепи и трех из легкой цепи) в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности.

Антитела (связывающиеся с Fc-гамма-рецептором IIВ) (в том числе их фрагменты и производные) преимущественно повышают уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIВ в клетках Daudi приблизительно в 1,5, 2, 3 или более раз, как, например, приблизительно в 4 раза или более, приблизительно в 5 раз или более, приблизительно в 6 раз или более, приблизительно в 7 раз или более, приблизительно в 8 раз или более, приблизительно в 9 раз или более или приблизительно в 10 раз (т.е. даже почти в 10 раз), по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом. Для такого сравнения антитело применяют в количестве в диапазоне от 5 до 50 мкг/мл, как, например, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл.

Из результатов, приведенных на фиг. 6-8, очевидно, что любое из химерного антитела 8A6 (ch8A6) (содержащего вариабельные области крысы и константную область человека) или гуманизированного антитела 8A6 (hu8A6) существенно повышает уровень фосфорилирования ITIM по сравнению с антителом GB3, известным из уровня техники. Принимая во внимание, что CDR у химерного и гуманизированного антител 8A6 являются практически идентичными, тогда как их каркасные участки (FR) отличаются, и что активность обоих антител в отношении повышения уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIВ является практически одинаковой (см. фиг. 8), разумно сделать вывод, что CDR обуславливают преимущественное свойство антител, раскрытых в данном документе, заключающееся в существенном повышении уровня фосфорилирования ITIM, например, по сравнению с антителом GB3, известным из уровня техники.

Специалист в данной области без труда способен трансплантировать CDR, описанные в данном документе, для второго связывающего домена антитела на соответствующий каркасный участок или, наоборот, трансплантировать каркасные участки на второй связывающий домен антитела с CDR, описанными в данном документе, так, чтобы полученное в результате этого антитело обладало преимущественными свойствами, в частности свойством повышения уровня фосфорилирования ITIM CD32В, как описано в данном документе.

Как упоминалось, антитела, раскрытые в данном документе, обладают свойством повышения уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIВ (CD32В) в клетках Daudi по сравнению с антителом GB3, известным

из уровня техники, описанным в WO 2005/051999, которое характеризуется наличием вариабельной области тяжелой цепи, приведенной под SEQ ID NO: 7 в WO 2005/051999 (см. SEQ ID NO: 26), и вариабельной области легкой цепи, приведенной под SEQ ID NO: 5 в WO 2005/051999 (см. SEQ ID NO: 27).

Повышение уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIB (CD32B) в клетках Daudi под воздействием антитела является приблизительно 4-кратным или большим, приблизительно 5-кратным или большим, приблизительно 6-кратным или большим, приблизительно 7-кратным или большим, приблизительно 8-кратным или большим, приблизительно 9-кратным или большим или приблизительно 10-кратным (т.е. даже почти 10-кратным) по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Фосфорилирование ITIM CD32B (Fc-гамма-рецептора IIB) в клетках Daudi предпочтительно определяют следующим образом.

$3 \times 10^5$  клеток Daudi, суспендированных в среде RPMI 1640, дополненной 1% FBS (фетальной бычьей сывороткой крови), оставляют необработанными (контроль) либо инкубируют в течение 25 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> со смесью антител, содержащей антитело мыши к IgM человека (α-hIgM) и антитело кролика к IgG мыши (α-mIgG), где смесь антител содержит 2 мкг/мл α-hIgM (mAB, клон UHB) и 20 мкг/мл α-mIgG. Затем клетки обрабатывают в течение 20 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> антителом, раскрытым в данном документе, или представляющей интерес молекулой, определенной в данном документе ниже, такой как антитело GB3 из WO 2005/051999, соответственно, при этом как антитело, так и представляющую интерес молекулу предпочтительно применяют в равных концентрациях и необязательно с буфером в качестве контроля (без антитела). Клетки собирают после инкубирования при 4°C, лизируют и подвергают вестерн-блот-анализу, в ходе которого фосфорилирование выявляют с помощью антитела к фосфотирозину (антитела к CD32B (с фосфорилированным Y292)). В ходе вестерн-блоттинга необязательно проводят зондирование с использованием антитела, выявляющего, например, β-актин, который служит в качестве контроля нагрузки для вестерн-блот-анализа. В качестве альтернативы клеткам Daudi можно применять РВМС или клетки Raji. Соответственно во всех вариантах осуществления, в которых применяют клетки Daudi при определении фосфорилирования ITIM, клетки Daudi можно заменить клетками Raji или РВМС.

Антитело к фосфотирозину предпочтительно связано с группой, генерирующей сигнал. Группа, генерирующая сигнал, относится к композиции, выявляемой с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств. Например, применимые метки включают радиоактивные метки, такие как <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S или <sup>125</sup>I; флуоресцентные красители (например, Cy-3, Cy-5); хромофоры, электроноплотные реагенты; ферменты, которые генерируют выявляемый сигнал (например, широко применяемые в ELISA); или спин-метки. Метка или выявляемый фрагмент имеет или генерирует измеримый сигнал, такой как радиоактивный, хромогенный или флуоресцентный сигнал, который можно применять для количественного определения связанного выявляемого фрагмента в образце.

Группа, генерирующая сигнал, может быть ковалентно или нековалентно связана с антителом к фосфотирозину. Сигнал можно определять в виде сигнала, обеспечиваемого группой, генерирующей сигнал, в антителе к фосфотирозину. Сигнал может представлять собой любой сигнал, который поддается выявлению с помощью, например, спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

Повышение уровня фосфорилирования ITIM определяют путем сравнения (i) сигнала, генерируемого группой, генерирующей сигнал, в антителе к фосфотирозину, связывающемся с мотивом ITIM CD32B в клетках, которые были необработанными ("эталонное значение"), с (ii) сигналом, генерируемым группой, генерирующей сигнал, в антителе к фосфотирозину, связывающемся с мотивом ITIM CD32B в клетках, которые были обработаны антителом, раскрытым в данном документе, при этом если сигнал (ii) превышает сигнал (i), то под воздействием антитела, раскрытого в данном документе, произошло повышение уровня фосфорилирования ITIM CD32B. Для такого сравнения антитело применяют в количестве в диапазоне от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, как, например, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл. Например, при сравнении антитела GB3, известного из уровня техники, или любой другой молекулы, такой как антитело, связывающееся с CD32B (в совокупности называемых "представляющими интерес молекулами"), такого, которое связывается с эпитопом на CD32B, как описано в данном документе, и/или такого, которое является неблокирующим, как описано в данном документе, с антителом с целью определения способности представляющей интерес молекулы и антитела к повышению уровня фосфорилирования ITIM CD32B уровень фосфорилирования ITIM определяют, как описано выше для представляющей интерес молекулы и антитела. А именно, получают значение для сравнения представляющей интерес молекулы с необработанными клетками и значение для сравнения антитела с необработанными клетками. Эти значения можно сравнить друг с другом для того, чтобы определить, обладает ли антитело способностью к повышению уровня фосфорилирования ITIM в большей степени, как, например, в 4-10 раз (в том числе 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), чем представляющая интерес молекула. Для такого сравнения представляющую интерес молекулу и антитело применяют в количестве в диапазоне от 5 до 50 мкг/мл, как, например, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл.

Что касается вариабельной области тяжелой цепи второго связывающего домена (связывающегося с Fc-гамма-рецептором IIВ) антитела, раскрытого в данном документе, то в определенных вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 3, по меньшей мере с одной из мутаций, выбранных из группы, включающей замену аминокислоты Q в положении 1 на E, замену аминокислоты V в положении 11 на L, замену аминокислоты G в положении 42 на K, замену аминокислоты S в положении 50 на V, замену аминокислоты Y в положении 53 на S, замену аминокислоты K в положении 58 на T, замену аминокислоты G в положении 61 на A, замену аминокислоты S в положении 75 на T, замену аминокислоты K в положении 76 на R, замену аминокислоты N в положении 77 на S и замену аминокислоты T в положении 78 на N. Такое антитело характеризуется как содержащее константный домен IgE в качестве первого связывающего домена.

В случае, когда второй связывающий домен антитела представляет собой константный домен IgG или его часть, связывающиеся с Fc-гамма-рецептором IIВ, антитело характеризуется как содержащее константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 6, и/или константную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 7.

В антителе, раскрытом в данном документе, константная область тяжелой цепи содержит аланиновый остаток в положении 297 (N297A) в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU, которая описана Edelman и соавт. в 1969 г. (соответствует нумерации в последовательности, которая представлена под SEQ ID NO:6 и показана на фиг. 2). Антитела с тяжелой цепью, содержащей аланиновый остаток (Ala, A) в положении 297 (N297A), обозначаются в данном документе индексом "N297A", тогда как антитела с аспарагиновым остатком (Asn, N) в указанном положении представляют собой "дикий тип" и, следовательно, обозначаются в данном документе индексом "(wt)". Как можно увидеть на фиг. 2, вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела 8A6 дикого типа оканчивается аминокислотным остатком "S" в положении 113 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU. Константная область указанного антитела начинается в положении 118. Получаемый в результате кажущийся разрыв из 4 аминокислотных остатков вызван переходом на систему нумерации аминокислот в белке EU для константной области и не означает, что какие-либо аминокислотные остатки пропущены.

Такие константные домены с аланиновым остатком в положении 297 в аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:6, действительно характеризуются пониженной или отсутствующей антителозависимой клеточной цитотоксичностью вследствие пониженного или отсутствующего связывания Fc-части антитела с Fc-рецепторами. Аминокислотная последовательность такой константной области с N297A приведена под SEQ ID NO: 28. Соответственно, антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать в качестве константной области аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 28. У таких антител отсутствует гликозилирование в положении 297 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU. Таким образом, в данном документе раскрыты антитела, у которых отсутствует гликозилирование в положении 297 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU в константной области тяжелой цепи, и также охватываются антитела, которые гликозилированы в положении 297 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU в константной области тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления константный домен (Fc-домен) антитела, раскрытого в данном документе, имеет аллотип G1m17 и содержит аминокислоты K (Lys) в положении 214, E (Glu) в положении 356, M (Met) в положении 358 и A (Ala) в положении 431 при отсутствии C-концевого K (Lys) (Beck и соавт., 2010).

В случае, когда второй связывающий домен антитела представляет собой константный домен IgG или его часть, связывающиеся с Fc-гамма-рецептором IIВ, константный домен легкой цепи относится к аллотипу Km3 и может содержать аминокислоты A (Ala) в положении 153 и V (Val) в положении 191.

Используемый в данном документе термин "аллотип" относится к человеческому аллотипу антител, раскрытых в данном документе. Аллотипы представляют собой аллельные/генетические варианты в рамках последовательностей константных областей конкретных изоформ. Аллотипы наследуются по аллельному типу. Различные представители вида, таким образом, будут отличаться друг от друга тем, какие конкретные аллели данного изоформы они унаследовали от своих родителей. Km1 и Km2 представляют собой аллотипы каппа-цепей человека; G1m(4) и G1m(17) представляют собой аллотипы гамма-1-цепей человека.

В случае, когда второй связывающий домен антитела представляет собой константный домен IgG или его часть, связывающиеся с Fc-гамма-рецептором IIВ, антитело может содержать константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 6, и константную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 7. Такое антитело характеризуется первым связывающим доменом, представленным константным доменом IgE или его частью, который связывается с Fc-эпсилон-рецептором.

Что касается вариабельной области легкой цепи второго связывающего домена (связывающегося с Fc-гамма-рецептором IIВ) антитела, то в некоторых вариантах осуществления он содержит аминокис-

лотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 4, по меньшей мере с одной из мутаций, выбранных из группы, включающей замену аминокислоты Q в положении 1 на N, замену аминокислоты S в положении 28 на N, замену аминокислоты S в положении 31 на T, замену аминокислоты V в положении 33 на L, замену аминокислоты D в положении 34 на A, замену аминокислоты Y в положении 49 на F, замену аминокислоты T в положении 53 на N, замену аминокислоты Y в положении 55 на A, замену аминокислоты L в положении 89 на Q и замену аминокислоты N в положении 93 на Y. Такое антитело характеризуется как содержащее константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 6, и/или константную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 7. Такое антитело дополнительно характеризуется первым связывающим доменом, который представляет собой константный домен IgE или его часть, связывающиеся с Fc-эпсилон-рецептором.

Антитело (связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIb) содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную под SEQ ID NO: 1 или 3, и/или переменную область легкой цепи, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 4. Соответственно, антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, приведенную под SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, приведенную под SEQ ID NO: 2, или она содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную под SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, приведенную под SEQ ID NO: 4.

Антитело (связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIb), раскрытое в данном документе, специфично связывается с эпитопом FcγRIIb человека в пределах аминокислот №№ 20-40 согласно SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело специфично связывается с эпитопом, содержащим мотив GTHSPES в SEQ ID NO: 5. Было показано, что этот аминокислотный мотив является очень специфичным эпитопом FcγRIIb. Антитела, специфично связывающиеся с этим эпитопом, не связываются с FcγRIIA человека. Связывание антитела с этим эпитопом посредством своей(своих) переменной(переменных) области(областей) предпочтительно не препятствует связыванию Fc-частей антител с рецептором и не блокирует нормальное физиологическое функционирование рецептора.

В некоторых вариантах осуществления антитело (связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIb) связывается *in vitro* с FcγRIIb человека с аффинностью, характеризующейся константой скорости диссоциации, составляющей по меньшей мере  $4,9 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Константу скорости диссоциации ( $k_{\text{off}}$ ) можно измерить с помощью экспериментов с поверхностным плазмонным резонансом. В частности, связывание антитела с sFcγRIIb можно проанализировать с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсора BIAcore T200 (GE Healthcare/Biacore).

Используемый в данном документе термин "аффинность" относится к силе связывания между переменными областями одной тяжелой и одной легкой цепей антитела или его фрагмента или производного и их антигеном (например, рецептором FcγRIIb), которая измеряется *in vitro*. Аффинность определяет силу взаимодействия между эпитопом и антигенсвязывающим участком антитела. Аффинность можно рассчитать с использованием следующей формулы:

$$KA = [AB-AG]/[AB]*[AG] = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$$

где KA - константа аффинности;

[AB] - молярная концентрация незанятых связывающих участков на антителе;

[AG] - молярная концентрация незанятых связывающих участков на антигене;

[AB-AG] - молярная концентрация комплекса антитело-антиген.

Используемый в данном документе термин "авидность" относится к мере общей прочности комплекса антитело-антиген, которая фактически зависит от параметров (1) аффинности антитела в отношении эпитопа, (2) валентности антитела и антигена и (3) структурного расположения взаимодействующих частей.

Предусматривается, что антитело может быть гликозилированным или дегликозилированным.

В случае, когда первый связывающий домен антитела, раскрытого в данном документе, представляет собой константный домен IgE или его часть, связывающиеся с Fc-эпсилон-рецептором, он может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 или 36 или ее часть.

Предпочтительная часть Fc-домена IgE содержит Cε3-домен и/или Cε4-домен (см. фиг. 15 и SEQ ID NO: 36). Эти домены гомологичны Cγ2 и Cγ3 IgG. В антителе IgG шарнирная область отвечает за необходимую гибкость антитела и образование димера посредством дисульфидных мостиков. Эта шарнирная область отсутствует в антителе IgE. Вместо нее эту функцию принимает на себя дополнительный Cε2-домен.

Другие иллюстративные части Fc-домена IgE включают в себя Cε2-, Cε3-и/или Cε4-домен (см. фиг. 15 и SEQ ID NO: 35).

Другой тип изменчивости касается разного количества участков N-гликозилирования в Fcε-домене. Для антитела IgE описано несколько участков гликозилирования: N265, N371, N383 и N394. Предусматривается, что один или более из этих участков остаются в неизменном состоянии или подвергаются мутации таким образом, что они больше не могут быть гликозилированными.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления антитело содержит в качестве первого связыва-

вающего домена Fc-домен IgE и может связываться *in vitro* с FcεRI человека с аффинностью, характеризующейся значением Kd по меньшей мере  $1,2 \times 10^{-7}$  (M).

В данном документе также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитело, описанное в данном документе. Используемые в данном документе термины "нуклеиновые кислоты" или "нуклеотидные последовательности" относятся к молекулам ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), РНК (мРНК), их комбинациям или гибридным молекулам, содержащим ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты могут быть двух- или однонитевыми и могут содержать одновременно двух- и однонитевые фрагменты. Наиболее предпочтительными являются двухнитевые молекулы ДНК.

Соответственно последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует раскрытое антитело, содержит нуклеотиды, кодирующие по меньшей мере те части антитела, которые придают антителу свойства специфичного связывания.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые последовательности нуклеиновых кислот кодируют варибельные области, такие как, по меньшей мере, CDR, описанные в данном документе.

Иллюстративные последовательности нуклеиновых кислот представлены под SEQ ID NO: 8-11. Специалист в данной области будет осведомлен, что эти нуклеотидные последовательности могут варьироваться в зависимости от используемых способов экспрессии и применяемых для этого систем.

В данном документе дополнительно предложен вектор на основе нуклеиновой кислоты, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, которые кодируют антитело, раскрытое в данном документе. Вектор предпочтительно содержит промотор, под контроль которого помещены вышеуказанные последовательности нуклеиновых кислот. Вектор может представлять собой вектор экспрессии у прокариот или эукариот, где рекомбинантная нуклеиновая кислота экспрессируется в отдельности либо в слиянии с другими пептидами или белками.

В данном документе также раскрыта клетка-хозяин, трансфицируемая вышеупомянутым вектором. Клетка-хозяин может представлять собой любую клетку, прокариотическую клетку или эукариотическую клетку, и ее можно применять для получения по меньшей мере частей антитела или его фрагмента или производного.

Также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в векторе на основе нуклеиновой кислоты, и извлечение полученного таким образом антитела.

Антитела, раскрытые в данном документе, можно преимущественно применять в фармацевтической композиции. Такую фармацевтическую композицию можно применять для лечения или профилактики заболеваний, ассоциированных с базофилами, предпочтительно аллергического заболевания.

Соответственно также предложены способы лечения или профилактики заболеваний, ассоциированных с базофилами, предпочтительно аллергических заболеваний, при этом указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела, раскрытого в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

"Аллергическое заболевание" или "аллергия" относится к определенным заболеваниям, при которых иммунные ответы на антигены окружающей среды вызывают воспаление тканей и дисфункцию органов. Аллергеном является любой антиген, который вызывает аллергию. Таким образом, он может представлять собой либо саму антигенную молекулу, либо ее источник, такой как пыльцевые зерна, клетки кожи животных, яд насекомых или пищевой продукт. IgE играет главную роль при аллергических заболеваниях. Высокоаффинные рецепторы IgE (FcεRI) расположены на тучных клетках и базофилах, которые служат в качестве антигенных мишеней, стимулирующих дальнейшее высвобождение медиаторов воспаления, которые вызывают многие проявления аллергического заболевания.

Термин "аллергическое заболевание" охватывает также IgE-опосредованное воспаление. "IgE-опосредованное воспаление" происходит тогда, когда антиген связывается с антителами IgE, которые занимают рецептор FcεRI на тучных клетках. В течение нескольких минут это связывание вызывает дегрануляцию тучной клетки с высвобождением определенных предварительно образованных медиаторов. Затем дегранулированная клетка начинает синтезировать и высвобождать дополнительные медиаторы *de novo*. Результатом этого является двухфазный ответ: начальный немедленный эффект в отношении кровеносных сосудов, гладкой мускулатуры и секреции желез (гиперчувствительность немедленного типа) с последующей клеточной инфильтрацией вовлеченного участка через несколько часов. IgE-опосредованное воспаление представляет собой механизм, лежащий в основе атопической аллергии (такой как сенная лихорадка, астма и атопический дерматит), системных анафилактических реакций и аллергической крапивницы (сыпи). Оно может в обычных условиях играть роль первой линии иммунологической защиты, поскольку оно вызывает быстрое расширение кровеносных сосудов, облегчая проход циркулирующих растворимых факторов и клеток к участку контакта с антигеном. Многие из наиболее пагубных характерных черт аллергического заболевания обусловлены действиями лейкоцитов, подвергнутых хемоаттракции.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к фармацевтической композиции, содержащей в



качестве активного ингредиента антители. Указанная фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, или вспомогательное вещество, или наполнитель. Антитела могут быть представлены в фармацевтически приемлемых композициях, которые известны из уровня техники или приведены в общепризнанной фармакопее для применения у животных, и более конкретно, у людей.

При желании композиция также может содержать незначительные количества увлажняющих или эмульгирующих средств или буферных средств, поддерживающих pH. Данные композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композиции можно составить в нейтральной форме или в форме соли.

Фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения те, которые образованы анионами, как, например, полученными из хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и те, которые образованы катионами, как, например, полученными из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Вышеупомянутую фармацевтическую композицию можно применять для лечения, или профилактики, или диагностики любого заболевания или нарушения, предпочтительно заболеваний, ассоциированных с базофилами, предпочтительно аллергического заболевания.

Значения величины дозы и частоты введения охватываются терминами "терапевтически эффективный" и "профилактически эффективный". Кроме того, доза и частота введения, как правило, будут варьироваться в соответствии с факторами, специфическими для каждого пациента, в зависимости от конкретных вводимых терапевтических или профилактических средств, типа заболевания, пути введения, а также возраста, массы тела, реакции и анамнеза пациента. Подходящие схемы могут быть выбраны специалистом в данной области. Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтически активного компонента или средства, которое является достаточным для лечения или уменьшения интенсивности проявлений заболевания или нарушения, для задержки начала проявления заболевания или которое обеспечивает какое-либо терапевтическое преимущество в лечении или управлении течением заболевания.

Для антител, которые являются иллюстративными антителами, охватываемыми в данном документе, доза, вводимая пациенту, как правило, составляет от 0,0001 до 100 мг/кг массы тела пациента. Иллюстративные вводимые дозы составляют от приблизительно 0,1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 75 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 12, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 17, приблизительно 20 или приблизительно 25 мг/кг. Хорошо известно, что антитела человека характеризуются более длительным временем полужизни в организме человека, чем антитела от других видов. Таким образом, дозу и частоту введения антител или их фрагментов или производных можно уменьшить по сравнению с обычно используемыми дозами антител от других видов.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством антител или их фрагментов или производных может включать однократное лечение или предпочтительно может включать курс лечения. В определенных вариантах осуществления субъекта можно обрабатывать антителами или их фрагментами или производными в диапазоне доз, раскрытых выше, один раз в неделю в течение от приблизительно 1 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 8 недель, более предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 7 недель. Можно выбрать наиболее преимущественную форму и способ применения для обеспечения наибольшей пользы для пациента, подлежащего лечению.

Способы введения антитела или его фрагмента или производного включают без ограничения парентеральное введение (например, внутрикочное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и чресслизистое (например, интраназальный и пероральный пути). В конкретном варианте осуществления антитела вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным путем, например посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальную или кожно-слизистую выстилку (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.), и их можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным. Кроме того, можно также использовать легочное введение, например, путем использования ингалятора или небулайзера, а также составления со средством, образующим аэрозоль.

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" и "лечение" относятся к введению субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству фармацевтической композиции или антитела, которое является достаточным для лечения или уменьшения интенсивности проявлений заболевания или нарушения, для задержки начала проявления заболевания или обеспечения какого-либо терапевтическо-

го преимущества в лечении или управлении течением заболевания.

Используемый в данном документе термин "профилактика" относится к применению средства для предупреждения начала проявления заболевания или нарушения. "Профилактически эффективное количество" определяет количество активного компонента или фармацевтического средства, достаточное для предупреждения начала проявления или рецидива заболевания.

Используемые в данном документе термины "нарушение" и "заболевание" используют взаимозаменяемо по отношению к состоянию субъекта. В частности, термин "аутоиммунное заболевание" используют взаимозаменяемо с термином "аутоиммунное нарушение" по отношению к состоянию субъекта, характеризующемуся повреждением клеток, тканей и/или органов, вызванным иммунной реакцией субъекта на его собственные клетки, ткани и/или органы.

Более того, раскрытые антитела можно применять в целях диагностики для выявления, диагностирования или мониторинга заболеваний или нарушений, в частности аутоиммунных заболеваний. Антитела или их фрагменты или производные можно применять для анализа уровней FcγRIIB в биологическом образце с применением классических иммуногистологических способов, которые описаны в данном документе или известны специалисту в данной области (например, см. Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096). Другие способы с использованием антител, применимые для выявления экспрессии генов белков, включают иммунологические анализы, такие как твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA) и радиоиммунный анализ (RIA).

Таким образом, настоящее раскрытие дополнительно относится к диагностической композиции, содержащей антитело, раскрытое в данном документе.

#### Последовательности

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 2: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 3: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизованного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 5: аминокислотная последовательность FcγRIIB человека.

SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи гуманизованного антитела hu8A6\_wt.

SEQ ID NO: 7: аминокислотная последовательность константной области легкой цепи гуманизованного антитела hu8A6\_wt.

SEQ ID NO: 8: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область тяжелой цепи гуманизованного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 9: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область легкой цепи гуманизованного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 10: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константную область тяжелой цепи гуманизованного антитела hu8A6\_wt.

SEQ ID NO: 11: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константную область легкой цепи гуманизованного антитела hu8A6\_wt.

SEQ ID NO: 12: аминокислотная последовательность растворимого FcγRIIA человека (sFcγRIIA).

SEQ ID NO: 13: аминокислотная последовательность мутантного растворимого FcγRIIA человека (sFcγRIIAmut).

SEQ ID NO: 14: аминокислотная последовательность CDR1 варибельной области тяжелой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 15: аминокислотная последовательность CDR2 варибельной области тяжелой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 16: аминокислотная последовательность CDR3 варибельной области тяжелой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 17: аминокислотная последовательность CDR1 варибельной области легкой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 18: аминокислотная последовательность CDR2 варибельной области легкой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 19: аминокислотная последовательность CDR3 варибельной области легкой цепи антитела крысы 8A6.

SEQ ID NO: 20: аминокислотная последовательность CDR1 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 21: аминокислотная последовательность CDR2 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 22: аминокислотная последовательность CDR3 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 23: аминокислотная последовательность CDR1 варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 24: аминокислотная последовательность CDR2 варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 25: аминокислотная последовательность CDR3 варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO: 26: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела GB3 (см. также SEQ ID NO: 7 в WO 2005/051999).

SEQ ID NO: 27: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела GB3 (см. также SEQ ID NO: 5 в WO 2005/051999).

SEQ ID NO: 28: аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи, содержащая в положении 297 замену N на A (при допущении, что положение 1 в последовательности, которая приведена в перечне последовательностей, представляет собой положение 118).

SEQ ID NO: 29: аминокислотная последовательность CDR1 варибельной области тяжелой цепи, которая содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO: 30: аминокислотная последовательность CDR2 варибельной области тяжелой цепи, которая содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO: 31: аминокислотная последовательность CDR3 варибельной области тяжелой цепи, которая содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO: 32: аминокислотная последовательность CDR1 варибельной области легкой цепи, которая содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO: 33: аминокислотная последовательность CDR2 варибельной области легкой цепи, которая содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO: 34: аминокислотная последовательность CDR3 варибельной области легкой цепи, которая содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO: 35: аминокислотная последовательность Fc-домена IgE, содержащая домены 2, 3 и 4.

SEQ ID NO: 36: аминокислотная последовательность Fc-домена IgE, содержащая домены 3 и 4.

SEQ ID NO: 37: последовательность плазмидной ДНК, кодирующей sFcεRIα.

SEQ ID NO: 38: аминокислотная последовательность пептида формилметионин-лейцин-фенилаланин.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса гуманизированного 8A6 согласно SEQ ID NO: 3 и 4 в формате дикого типа либо N297A, ch8A6\_N297A (согласно SEQ ID NO: 14 и 15) и chGB3\_N297A.

Фиг. 2 - последовательности hu8A6\_wt и hu8A6\_N297A с изображением положения замены аминокислоты N на A в формате N297A.

Фиг. 3 - неблокирующие характеристики ch8A6\_N297A. Клетки Raji инкубировали с установленным количеством агрегированного IgG человека и различными количествами ch8A6\_N297A, chGB3\_N297A или блокирующих антител 2B6 или Ab R&D. Антитела являются неблокирующими.

Фиг. 4 - связывание очищенного с помощью белка A антитела (hu8A6\_VL + hu8A6\_VH и ch8A6\_N297A) в концентрациях от 15 до 0,005 мкг/мл с нативным FcγRIIB, экспрессируемым на клетках Raji. Гуманизированные варианты 8A6 связываются с FcγRIIB, экспрессируемым на клетках Raji, с высокой авидностью.

Фиг. 5 - связывание 15 мкг/мл антитела (hu8A6\_VH + hu8A6\_VL и ch8A6\_N297A) с нативным FcγRIIA, экспрессируемым на клетках K562. Антитела не связываются с FcγRIIA на K-562.

Фиг. 6a - фосфорилирование ITIM, уровень которого повышается химерным 8A6 (ch8A6\_N297A), в PBMC от здорового донора. PBMC от здорового донора выделяли с применением разделения с помощью фиколла, а затем оставляли необработанными или инкубировали в течение 25 мин со смесью антител, содержащей антитело к IgM (антитело мыши к иммуноглобулину человека) и антитело (кролика) к IgG мыши. Затем клетки обрабатывали в течение 20 мин 5 мкг/мл ch8A6\_N297A либо буфером в качестве контроля (без антитела). Клетки собирали после инкубирования и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу. В-актин = контроль нагрузки.

Фиг. 6b - контрольный эксперимент по фосфорилированию ITIM. Клетки Daudi оставляли необработанными или обрабатывали в течение 25 мин антителом изотипического контроля, поликлональным антителом к IgM человека (поликлональное антитело к hIgM), моноклональным антителом к IgM человека (антитело к hIgM), антителом к hIgM + 5 мкг/мл ch8A6\_N297A, антителом кролика к IgG мыши (α к IgG мыши), α к IgG мыши + 5 мкг/мл ch8A6\_N297A, смесью антитела к hIgM и α к IgG мыши (смесь Ab) или смесью Ab + 5 мкг/мл ch8A6\_N297A. β-актин = контроль нагрузки.

Фиг. 6c - антитела по настоящему изобретению усиливают фосфорилирование ITIM при наличии и

в отсутствие перекрестного сшивания/коагирования BCR и Fc-гамма RUB (FcγRIIB) в первичных РВМС.

Фиг. 7 - сравнение ch8A6\_N297A с антителом, известным из существующего уровня техники (chGB3\_N297A). Клетки Daudi человека инкубировали в течение 25 мин со смесью антител, содержащей антитело к IgM (антитело мыши к иммуноглобулину человека) и антитело (кролика) к IgG мыши, или оставляли необработанными. Затем клетки обрабатывали в течение 20 мин различными количествами chGB3\_N297A или ch8A6\_N297A либо буфером в качестве контроля (без антитела). Клетки собирали после инкубирования и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу. β-актин = контроль нагрузки.

Фиг. 8 - сравнение эффекта гуманизированного варианта hu8A6\_N297A, а также ch8A6\_N297A и chGB3\_N297A в отношении фосфорилирования ITIM в первичных РВМС. После перекрестного сшивания BCR и FcγRIIB с помощью смеси антител добавляли различные антитела в концентрации 5 мкг/мл и проводили вестерн-блот-анализ в отношении фосфорилирования ITIM. β-актин = контроль нагрузки.

Фиг. 9 - совместная иммунопреципитация фосфорилированной SHIP-1 и ITIM FcγRIIB. После стимуляции клеток Daudi смесью антител и любым из ch8A6\_N297A, блокирующего антитела 2B6, связывающегося с FcγRIIB, или chGB3\_N297A (5 мкг/мл) FcγRIIB осаждали из клеточных лизатов, и проводили вестерн-блот-анализ в отношении фосфатазы SHIP-1. Панспецифическое антитело к CD32 (AF1330), используемое в качестве антитела к CD32 = контроль нагрузки.

Фиг. 10 - сравнение гуманизированных вариантов 8A6 (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7) с ch8A6\_N297A. Клетки Daudi оставляли для инкубирования в течение 25 минут с буфером (без обработки) или со смесью (смесь антител), содержащей антитело к IgM (антитело мыши к иммуноглобулину человека) и антитело (кролика) к IgG мыши. Затем клетки обрабатывали в течение 20 минут 0,25 мкг/мл ch8A6\_N297A либо гуманизированными вариантами 8A6 (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7). Клетки собирали после инкубирования и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу. β-актин = контроль нагрузки.

Фиг. 11 - сравнение гуманизированных вариантов 8A6 (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7) с ch8A6\_N297A, блокирующим антителом, связывающимся с FcγRIIB, и chGB3\_N297A. Клетки Daudi оставляли для инкубирования в течение 25 мин с буфером (без обработки) или со смесью (смесь антител), содержащей антитело к IgM (антитело мыши к иммуноглобулину человека) и антитело (кролика) к IgG мыши. Затем клетки обрабатывали в течение 20 минут любым из 0,25 мкг/мл ch8A6\_N297A, гуманизированных вариантов 8A6 (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7), блокирующего антитела 2B6, связывающегося с FcγRIIB, или chGB3\_N297A.

Клетки собирали после инкубирования, лизировали в соответствии с протоколом и анализировали с помощью вестерн-блот-анализа. Лизаты подвергали WB-анализу. β-актин = контроль нагрузки.

Фиг. 12 - схема эксперимента для мышинной модели SLE-PBL. PBL от пациентов-людей со SLE переносят мышам с ослабленным иммунитетом. PBL-клетки трансплантируют, и мышей затем обрабатывают контролем (PBS) или антителом ch8A6\_N297A, связывающимся с FcγRIIB, согласно настоящему изобретению.

Фиг. 13 - уровень общего IgG человека [мкг/мл] у мышей, которым трансплантировали PBL от доноров-людей, страдающих SLE. Изображены мыши, обработанные контролем (№ 2, PBS) или ch8A6\_N297A (№ 3 и 4).

Фиг. 14 - снижение уровня специфичных для конкретного заболевания антител IgG человека к ДНК у обработанных ch8A6\_N297A мышей, начиная с 4 недели после переноса/трансплантации SLE-PBL с использованием PBL от доноров-людей, страдающих SLE. Изображены титры антител IgG к ДНК у двух различных мышей, № 3 и 4 (обработанных ch8A6\_N297A), под № 2 показан контроль с PBS.

Фиг. 15 - конструкторы, состоящие из Fab-домена химерного антитела IgG, специфичного к FcγRIIB, и Fcε-домена антитела IgE. Конструкторы отличаются перестройкой Fab из IgG и Fcε-домена (В. с Cε2-доменом, С. без Cε2, но с шарнирной областью IgG) и количеством участков N-гликозилирования. Для сравнения показано схематическое изображение полной молекулы IgG и полной молекулы IgE (А).

Фиг. 16 - связывание 8A6-IgE с SM101 (sFcγRIIB), тестируемое с помощью ELISA. На чертеже изображен иллюстративный эксперимент по методу ELISA. Варианты ch8A6-IgE характеризуются такой же аффинностью к антигену SM101 (растворимому FcγRIIB), как и химерное антитело, связывающееся с Fc-гамма RIIB.

Фиг. 17 - связывание вариантов 8A6\_IgE с sFcεRIα, определяемое с помощью ELISA. На чертеже изображен иллюстративный эксперимент по методу ELISA. Гуманизированные варианты антител на основе IgE, связывающихся с Fc-гамма RIIB, связываются с sFcεRIα с такой же аффинностью, как и соответствующая химерная версия антитела на основе IgE, связывающегося с Fc-гамма RIIB.

Фиг. 18 - связывание с клетками антитела на основе IgE, связывающегося с FcγRIIB, посредством FcγRIIB, экспрессируемого на клетках Raji. На чертеже изображен иллюстративный эксперимент по методу FACS, который проводили с вариантами 8A6\_сє2-4degly и 8A6\_сє3-4degly в сравнении с ch8A6\_N297A. Оба варианта 8A6-IgE, равно как и ch8A6\_N297A, характеризуются одинаковой аффинностью к нативному антигену FcγRIIB.

Фиг. 19 - связывание 8A6-IgE с SM101, тестируемое с помощью ELISA. На чертеже изображен иллюстративный эксперимент по методу ELISA. Гуманизированные варианты 8A6-IgE характеризуются такой же аффинностью к антигену SM101 (растворимому FcγRIIB), как и химерное антитело, связывающееся с Fc-гамма-рецептором IIB.

Фиг. 20 - связывание вариантов 8A6-IgE с sFcεRIα, определяемое с помощью ELISA. На чертеже изображен иллюстративный эксперимент по методу ELISA. Гуманизированные варианты антител на основе IgE, связывающихся с Fc-гамма RIIB, связываются с sFcεRIα с такой же аффинностью, как и соответствующая химерная версия антитела на основе IgE, связывающегося с Fc-гамма RIIB.

Фиг. 21 - тестирование связывания меченого 8A6-IgE-Fluo488 с клетками Raji. Связывание флуоресцентно меченного конструктора с FcγRIIB тестировали на клетках Raji, а клетки CHO (отрицательные по FcγRIIB) служили в качестве контроля. Оценивали флуоресценцию в FITC-канале.

Фиг. 22 - связывание ch8A6\_сє2-4-degly и ch8A6\_N297A с В-клетками в PBMC. FACS-анализ связывания 8A6-IgE (левый блок), 8A6-IgE, маскированного с помощью SM101 (средний блок), и 8A6-IgG (правый блок) с В-клетками. В моменты времени, определенные справа, В-клетки после окрашивания с помощью α-hCD19-РєCy7 анализировали на связывание с 8A6-IgE с помощью FACS-анализа. Числа в правом верхнем квадранте отражают среднюю интенсивность флуоресценции в указанном квадранте.

Фиг. 23 - стратегия гейтирования для выявления базофилов. CD193-положительные клетки с низким значением SSC гейтировали как базофилы. Использовали квадрантные гейты, в которых экспрессию CD63 в необработанных клетках принимали равной 0.

Фиг. 24 - экспрессия CD63 в базофилах, обработанных с помощью 8A6\_N297A и 8A6\_сє2-4-degly в разных концентрациях. Для исключения потенциальных эффектов активации 8A6N297A и 8A6\_сє2-4-degly самими по себе образцы, которые инкубировали с 8A6N297A и 8A6\_сє2-4-degly в течение ночи, анализировали в отношении их экспрессии CD63 без дополнительной активации антигеном.

Фиг. 25 - инкубирование с LPS в качестве контроля для 8A6\_сє2-4-degly. Цельную кровь инкубировали с 50 EU/мл LPS в течение 24 ч, и анализировали экспрессию CD63.

Фиг. 26 - активация контролей через 6 ч.

Фиг. 27 - активация образцов, обработанных 8A6-IgG или 8A6-IgE, через 6 ч.

Фиг. 28 - активация контролей через 24 ч.

Фиг. 29 - активация образцов, обработанных 8A6-IgG или 8A6-IgE (дегликозилированным 8A6-сє2-сє4), через 24 ч.

Фиг. 30 - тест активации пылью.

### Примеры

Создание антител, связывающихся с Fc-гамма-рецептором IIB.

Пример 1. Получение моноклонального антитела 8A6.

Моноклональное антитело клона 8A6 получали путем иммунизации крыс Long-Evans рекомбинантным растворимым рецептором FcγRIIB человека. Получали линии клеток гибридом из клеток селезенки крысы и подвергали скринингу в отношении антител, которые специфично связываются с FcγRIIB человека с большей аффинностью, чем с FcγRIIA. Во-вторых, антитела, вырабатываемые вышеупомянутыми гибридомами, подвергали скринингу в отношении неблокирующих характеристик, т.е. того, чтобы эти антитела по-прежнему обеспечивали возможность связывания IgG или IC с мембраносвязанным FcγRIIB, с использованием методик, известных из уровня техники.

50 мкг очищенного рекомбинантного растворимого FcγRIIB человека (sFcγRIIB, SEQ ID NO: 5) инъецировали внутривенно (i.v.) и подкожно (s.c.) крысам LOU/C с применением неполного адьюванта Фрейнда, дополненного 5 нмоль CpG 2006 (TIB MOLBIOL, Берлин, Германия). После шестинедельного интервала вводили конечную бустерную дозу 50 мкг sFcγRIIB и CpG 2006 i.p. и s.c. за три дня до слияния. Слияние линии клеток миеломы с иммунными клетками селезенки крысы осуществляли в соответствии со стандартными процедурами. Образцы надосадочной жидкости гибридомы тестировали в твердофазном иммунологическом анализе с белком sFcγRIIB или нецелевым белком sFcγRIIA (SEQ ID NO: 12), которыми были покрыты планшеты для ELISA. MAб из надосадочной жидкости культуры тканей, связанные с белками, выявляли с применением mAb, конъюгированных с HRP, к изотипам IgG крысы (антитела TIB 173 к IgG2a, антитела TIB 174 к IgG2b, антитела TIB 170 к IgG1, все из которых получены из ATCC, антитела R-2с к IgG2с, полученного самостоятельно), таким образом избегая mAb из класса IgM. MAб 8A6 (IgG2a крысы) распознавало FcγRIIB и не связывалось с FcγRIIA при использовании в антиген-специфическом анализе по методу ELISA. Анализ с использованием FACS применяли для скрининга антител в отношении специфичного связывания нативного антигена. Кроме того, антитела

подвергали скринингу в отношении неблокирующих характеристик, т.е. того, чтобы эти антитела по-прежнему обеспечивали возможность связывания IgG или иммунных комплексов с мембраносвязанным Fc $\gamma$ RIIB.

Для получения достаточного количества антитела для определения характеристик химерных и гуманизированных конструкторов клетки CHO-S FreeStyle™ подвергали транзientной трансфекции.

За день до трансфекции клетки высевали в количестве  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в среде с получением конечной концентрации клеток  $20 \times 10^6$  клеток/мл. Для каждой трансфекции 3 мл суспензии клеток переносили в 6-луночный планшет. Плазмидную ДНК для трансфекции выделяли с использованием набора HiSpeed Plasmid Maxi (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя и элюировали H<sub>2</sub>O, не содержащей эндотоксинов.

Для каждой трансфекции 75 мкг плазмидной ДНК, кодирующей легкую цепь, и 75 мкг плазмидной ДНК, кодирующей тяжелую цепь, добавляли в суспензию клеток и осторожно перемешивали. Затем добавляли PEI (Polyplus) и осторожно перемешивали. Клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> при непрерывном встряхивании (100 об/мин). В суспензию клеток доливали среду до конечного объема 15 мл с достижением конечной концентрации клеток  $4 \times 10^6$  клеток/мл и переносили в колбу на 125 мл. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> при непрерывном встряхивании (100 об/мин), и через 6 дней надосадочную жидкость собирали путем 2-кратного центрифугирования (4000 об/мин, 5 мин). Надосадочную жидкость фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и определяли титр антитела (см. ниже).

Определение титра антитела проводили посредством двух разных способов HPLC, обращенно-фазовой (RP) HPLC и HPLC с белком А. Анализ по методу RP-HPLC проводили с использованием системы HPLC серии Agilent 1200. Данные анализировали с использованием программного обеспечения "ChemStation" версии B.04.02 для систем LC. Компоненты растворителя представляли собой: изопропанол (чистый для HPLC; Roth), ацетонитрил (градиентной чистоты для HPLC; Roth), H<sub>2</sub>O (профильтрованную через фильтр с размером пор 0,2 мкм) и тетрафторацетат (TFA) (для синтеза пептидов; Sigma). Растворитель А: H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA; растворитель В: 60% изопропанола, 30% ацетонитрила, 9,9% H<sub>2</sub>O и 0,1% TFA. Использовали колонку Phenomenex Jupiter (№ 525166-6) с размером пор 300 Å и разделяющий материал с диаметром частиц 5 мкм. Связанное антитело элюировали в линейном градиенте от 30 до 43% растворителя В за 10 мин. Выявление происходило при  $\lambda = 210$  нм с использованием детектора для ультрафиолетовой/видимой области спектра.

Анализ по методу HPLC с белком А проводили с использованием системы HPLC серии Agilent 1200. Данные анализировали с помощью программного обеспечения "ChemStation" модифицированной версии B.04.02. Применяли следующие растворители: растворитель А: 0,05 М Tris/HCl, 0,1 М глицин, 0,15 М NaCl, pH 8,0; растворитель В: 0,05 М Tris/HCl, 0,1 М глицин, 0,15 М NaCl, pH 3,0. Для анализа в аналитическую предколонку Upchurch размером 2 × 20 мм упаковывали 120 мкл среды для перфузионной хроматографии Applied Biosystems Poros® 20A (Life Technologies). Связанное антитело элюировали 100% растворителя В. В случае, когда собирали очищенное антитело, фракции нейтрализовали с помощью 56 мМ Tris с pH 8,0.

Экспрессируемые антитела очищали с помощью колонки HiTrap™ на 1 мл с рекомбинантным белком А FF (GE Healthcare) посредством жидкостной экспресс-хроматографии белков (Äkta Explorer). Подвижный буфер содержал 10 мМ Tris-HCl с pH 8,0, 150 мМ NaCl, элюирующий буфер содержал 100 мМ глицина, 150 мМ NaCl, pH 2,7. Элюированные антитела нейтрализовали 60 мМ Tris-HCl с pH 8,0, концентрировали, подвергали стерилизующей фильтрации и хранили при -80°C.

Пример 2. Скрининг и определение характеристик антитела 8A6.

Скрининг образцов надосадочной жидкости гибридом осуществляли с помощью методик, которые известны из существующего уровня техники, например анализа связывания с помощью ELISA, анализа с помощью Bioscye или анализа связывания с помощью FACS. Для тестирования специфичного связывания антигена химерным или гуманизированными вариантами 8A6 планшеты для ELISA (планшеты Nunc-Immuno, F96 Maxisorp) покрывали 1 мкг/мл sFc $\gamma$ RIIB, sFc $\gamma$ RIIA (SEQ ID NO: 12) или sFc $\gamma$ RIIAmut (SEQ ID NO: 13) в PBS (100 мкл/лунка) на ночь при 4°C. После 3 этапов промывки в 0,01% Tween в PBS проводили блокирование с помощью 2% BSA в PBS (300 мкл/лунка) в течение 2 ч при комнатной температуре. После 3 этапов промывки вносили серийные разведения очищенного антитела или надосадочной жидкости (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Очищенные антитела разводили в PBS с 2% BSA. Образцы надосадочной жидкости дополняли 10-кратным объемом PBS и 20% BSA с получением конечной концентрации 2% BSA в PBS. В качестве положительного контроля для Fc $\gamma$ RIIA использовали антитело козы, связывающееся с Fc $\gamma$ RIIA человека (R&D Systems, AF1875). После 3 этапов промывки в 0,01% Tween в PBS соответствующее вторичное антитело ослы к иммуноглобулину козы, конъюгированное с HRP (F(ab')<sub>2</sub>, Jackson-Immuno-Research), или антитело козы к иммуноглобулину человека, конъюгированное с HRP (F(ab')<sub>2</sub>, Dianova), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (100 мкл/лунка). Лунки промывали 6 раз в 0,01% Tween в PBS. Добавляли субстрат (OPD, содержащий 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100 мкл/лунка) и реакцию останавливали путем добавления 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

(50 мкл/лунка). Затем измеряли поглощение на спектрометре при длине волны 492 нм.

Анализ специфического связывания с нативным антигеном химерного или гуманизированных вариантов 8А6 проводили посредством связывания с клетками на клетках Raji (ATCC® CCL-86™) и K-562 (ATCC® CCL-243™).

Клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) и промывали в буфере для FACS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса, 1% FCS, 0,01% NaN<sub>3</sub>). После дополнительного этапа центрифугирования клетки ресуспендировали в буфере для FACS с получением конечной концентрации клеток 2 × 10<sup>6</sup> клеток/мл и 50 мкл суспензии клеток добавляли аликвотами в 96-луночный планшет с U-образным дном. Готовили серийные разведения гуманизированных вариантов и ch8A6 в буфере для FACS.

Для подтверждения экспрессии FcγRIIA на клетках K-562 антитело мыши к CD32 человека (Stem Cell Technologies Inc., клон VI.3) разводили в буфере для FACS. 50 мкл разведенных антител добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали 2 раза в буфере для FACS. Затем 50 мкл вторичного антитела козы к IgG человека, конъюгированного с PE (F(ab')<sub>2</sub>, Dianova), или вторичного антитела козы к IgG мыши, конъюгированного с PE (F(ab')<sub>2</sub>, Dianova), разводили в буфере для FACS, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После 2 этапов промывки в буфере для FACS клетки ресуспендировали в 300 мкл буфера для FACS и измеряли на приборе BD FACSCanto™ II (программное обеспечение: BD FACSDiva™).

Для определения того, обеспечивают ли антитела, связывающиеся с FcγRIIB, по-прежнему возможность связывания IgG или иммунных комплексов с мембраносвязанным FcγRIIB, проводили анализ с использованием FACS. Клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) и промывали в буфере для FACS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса, 1% FCS, 0,01% NaN<sub>3</sub>). После дополнительного этапа центрифугирования клетки ресуспендировали в буфере для FACS с получением конечной концентрации клеток 2 × 10<sup>6</sup> клеток/мл. Готовили серийные разведения антител (ch8A6\_N297A, chGB3\_N297A, Ab R&D mab1875) в буфере для FACS. 25 мкл разведенных антител смешивали в 96-луночном планшете с U-образным дном с 25 мкл меченого Alexa488 агрегированного бериглобина (2,5 мкл/лунка). Агрегированный IgG человека выделяли с помощью эксклюзионной хроматографии на Superdex-200 (16/60) из коммерчески доступного общего IgG-продукта (бериглобина).

50 мкл суспензии клеток добавляли к смеси антитело-бериглобин и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клетки промывали 2 раза в буфере для FACS. Затем 50 мкл вторичного антитела козы к IgG человека, конъюгированного с PE (F(ab')<sub>2</sub>, Dianova), или вторичного антитела к иммуноглобулину крысы, конъюгированного с PE, разводили в буфере для FACS, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После 2 этапов промывки в буфере для FACS клетки ресуспендировали в 300 мкл буфера для FACS и измеряли на приборе BD FACSCanto™ II (программное обеспечение: BD FACSDiva™) (фиг. 3).

Анализ связывания с помощью FACS.

Анализ специфического связывания с нативным антигеном химерного или гуманизированных вариантов 8А6 проводили посредством связывания с клетками на клетках Raji и K-562.

Клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) и промывали в буфере для FACS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса, 1% FCS, 0,01% NaN<sub>3</sub>). После дополнительного этапа центрифугирования клетки ресуспендировали в буфере для FACS с получением конечной концентрации клеток 2 × 10<sup>6</sup> клеток/мл и 50 мкл суспензии клеток добавляли аликвотами в 96-луночный планшет с U-образным дном. Готовили серийные разведения гуманизированных вариантов и ch8A6 в буфере для FACS.

Клетки Raji и K562 инкубировали с возрастающими концентрациями гуманизированных антител и химерным антителом в качестве контроля. Клетки Raji использовали для тестирования связывания с FcγRIIB (фиг. 4), клетки K562 - для анализа неспецифического связывания с FcγRIIA (фиг. 5). Связанные с клетками антитела выявляли с помощью вторичного антитела, конъюгированного с PE. Все гуманизированные варианты связывались с FcγRIIB с аффинностью, сравнимой с ch8A6\_N297A, и все гуманизированные варианты при этом связывались с FcγRIIB с большей avidностью, чем с FcγRIIA.

Связывание антител с sFcγRIIB и sFcγRIIA анализировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с применением биосенсора Biacore T200 (GE Healthcare/Biacore). Эксперименты проводили в лаборатории биоаналитики кафедры биологии и микробиологии LMU. Анализируемые антитела захватывали на сенсорном чипе CM5 серии S с применением набора для захвата антител человека в соответствии с протоколом производителя. Варианты Nu8A6 или ch8A6 захватывали в концентрации 10 нМ в течение 1 мин. Аналит sFcγRIIB инъецировали в различных концентрациях в течение 3 мин. Измерения осуществляли при 25°C и в непрерывном потоке (10 мкл/мин). Данные оценивали с применением программного обеспечения для оценки Biacore T200 (версии 1.0), предполагая связывание 1:1.

Пример 3. Химеризация антитела 8А6 крысы.

Химерное моноклональное антитело 8А6, связывающееся с FcγRIIB, конструировали путем слияния VH-области 8А6 крысы с сигнальным пептидом и константной области IgG1 человека. Кроме того, дегликозилированный вариант тяжелой цепи создавали с применением константного домена IgG1, со-

держашего мутацию N297A. Для конструирования гена легкой цепи 8A6 VL-область 8A6 крысы аналогичным образом сливали с сигнальной последовательностью и последовательностью для константной области каппа-цепи человека с последующим субклонированием в вектор экспрессии у млекопитающих.

Анализы *in vitro*.

Клетки, реагенты и антитела.

Линии клеток лимфомы Беркитта человека Daudi и Ramos приобретали у DSMZ (ACC 78 и ACC 603) и выдерживали в RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen), дополненной 10% FBS (Gibco/Invitrogen), NEAA MEM (Gibco/Invitrogen), 1 мМ пирувата натрия (Gibco/Invitrogen) и 2 мМ L-глутамин (Gibco/Invitrogen), при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Первичные В-клетки человека очищали от гепаринизированной крови здоровых доноров с применением градиентов плотности фиколла (Leucosep, Greiner Bio-One, раствор для разделения Biocoll, Biochrom) и негативного магнитного выделения (Dynabeads Untouched для В-клеток человека, Invitrogen). Чистоту обогащенных В-клеток изучали с помощью FACS-анализа путем окрашивания антителом к hCD19, конъюгированным с APC (BD Pharmingen № 555415), антителом к hCD3, конъюгированным с PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences № 332771), и антителом к hCD56, конъюгированным с PE (BD Pharmingen № 555515). Первичные В-клетки сразу же использовали для экспериментов без дополнительного культивирования. Блокирующее антитело 2B6, связывающееся с FcγRIIB, соответствовало EP1534335.

Протокол стимуляции с использованием стимулирующей смеси растворимых антител.

Для одновременной стимуляции BCR и FcγRIIB создавали систему антител с применением смеси антител из 2 мкг/мл моноклонального антитела мыши к hIgM (Southern Biotech, № 9022-01, клон UHB) и 20 мкг/мл моноклонального антитела кролика к mIgG(1,2a,3) (Epitomics, № 3020-1, клон M111-2), у которых Fc-часть перекрестно реагирует с рецептором FcγRIIB человека. Контрольные эксперименты проводили с 20 мкг/мл поликлонального антитела кролика к hIgM (Antibodies Online, № ABIN 117299) или смесью, содержащей 2 мкг/мл антитела hIgM и изотипического контроля mIgG2b (клон MPC-11, BD Pharmingen, № 557351). 3 × 10<sup>6</sup> клеток из линий клеток лимфомы Daudi или Ramos и первичных В-клеток собирали путем центрифугирования и инкубировали с различными стимулирующими смесями в среде для анализа (RPMI 1640 + 1% FBS) в течение 20 мин при 37°C.

Затем к образцам добавляли 5 мкг/мл связывающихся с FcγRIIB антител ch8A6 (0,8 мкл в разведении 1:10), 2B6 (1,5 мкл в разведении 1:10) или chGB3\_N297A (1,1 мкл в разведении 1:10) и клетки дополнительно инкубировали в течение 25-30 мин. Лизис осуществляли, как описано отдельно.

Вестерн-блот-анализ паттернов фосфорилирования.

Лизис клеток.

Клетки осаждали при 4°C, промывали ледяным PBS и инкубировали в 10 мкл буфера для лизиса (буфера для RIPA (Cell Signaling), дополненного ингибиторами фосфатаз (PhosStop, Roche), ингибиторами протеаз (Complete Ultra Mini, без EDTA, Roche) и 1 мМ PMSF (Fluka Biochemica) в течение 30-45 мин на льду.

SDS-PAGE.

После центрифугирования образцы надосадочной жидкости загружали в буфер для образца (буфер LDS для образца NuPAGE, восстановитель для образца NuPAGE, Invitrogen) и к ним применяли SDS-PAGE (гели NuPAGE Novex Bis-Tris Mini, подвижный буфер MES SDS (Invitrogen)). В случае SDS-PAGE добавляли буфер LDS для образца и восстановитель, и образцы нагревали до 95°C в течение 5 мин. Образцы хранили при -20°C или сразу же анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга.

Перенос белков на мембраны из PVDF и выявление.

Затем белки переносили на мембраны из PVDF (Roti-PVDF, Roth, буфер для переноса - 10 мМ Tris, 100 мМ глицина, 10% метанол, условия переноса: постоянный ток 240 мА, 90 мин при 4°C). Мембраны блокировали с помощью 5% BSA в TBS-T (10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween20) и окрашивали антителом, связывающимся с фосфорилированным FcγRIIB/CD32 (pY292) (Cell Epitomics, № 2308-1, 1:50000, при 4°C в течение ночи), или антителом к фосфорилированной SHIP (1:1000, Cell Signaling, № 3941) и конъюгированным с HRP антителом к иммуноглобулину кролика (Jackson ImmunoResearch, № 111-036-045, 1:50000 в TBS-T, 1 ч при комнатной температуре). Хемилуминесценцию (проявляемую с помощью Western Lightning Plus, Perkin Elmer) выявляли на рентгеновских пленках.

Стрипирование.

Для последующих анализов с использованием антител, направленных на другие фосфорилированные белки, мембраны подвергали стрипированию (Re-Blot Plus, Millipore) в течение 10 мин, промывали и блокировали перед окрашиванием антителом к β-актину (Sigma-Aldrich, № A1978, 1:50000 и конъюгированным с HRP антителом к IgG мыши, Sigma-Aldrich, № A9044) или антителами к другим сигнальным белкам.

Уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIB в PBMC от здорового донора существенно повышается раскрытыми антителами/

PBMC от здорового донора выделяли и оставляли необработанными либо инкубировали в течение 25 мин со стимулирующей смесью (моноклональное антитело мыши к hIgM и моноклональное антитело кролика к mIgG). Затем клетки обрабатывали ch8A6 либо буфером в качестве контроля. Клеточные лиза-



ты подвергали вестерн-блот-анализу с применением соответствующих детекторных антител, которые представлены в общих чертах выше. Было выявлено существенное повышение уровня фосфорилирования мотива ITIM FcγRIIB в клетках (PBMC, В-клетки) (фиг. 6а). В контрольных экспериментах со стимуляцией клеток стимулирующей смесью в отдельности или только моноклональным антителом мыши к hIgM, моноклональным антителом кролика к mIgG в комбинации с ch8A6 не было продемонстрировано повышение уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIB (фиг. 6б). Раскрытые антитела, таким образом, проявляют существенный эффект в отношении фосфорилирования ITIM в клетках человека с перекрестно сшитым BCR (В-клеточным рецептором) и мембраносвязанным (эндогенно экспрессируемым) FcγRIIB, но не в нестимулированных клетках, т.е. клетках без перекрестно сшитого BCR и мембраносвязанного FcγRIIB. В ходе аутоиммунного заболевания BCR и мембраносвязанный FcγRIIB будут перекрестно сшиваться ауто антигенами или иммунными комплексами (IC). Антитела способны к ингибированию функции патогенных аутореактивных В-клеток при аутоиммунном заболевании путем повышения уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIB. Антитела, однако, также способны к повышению уровня фосфорилирования ITIM в отсутствие перекрестно сшитого BCR (фиг. 6с).

Сравнение эффектов ch8A6 и антитела chGB3\_N297A.

Сравнение эффекта клона ch8A6\_N297A и клона chGB3\_N297A в отношении фосфорилирования ITIM. Клетки Daudi человека обрабатывали смесью антител, а затем ch8A6\_N297A, chGB3\_N297A или 2B6, как описано выше. Антитело chGB3\_N297A, подобно ch8A6\_N297A, является неблокирующим антителом, связывающимся с FcγRIIB, и распознает аналогичный эпитоп.

При добавлении ch8A6\_N297A к обработанным смесью антител клеткам было продемонстрировано повышение уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIB уже при концентрациях 0,05 мкг/мл. Хотя для возрастающих концентраций chGB3\_N297A была продемонстрирована дозозависимая стимуляция фосфорилирования ингибирующего мотива, неожиданно было выявлено, что данный клон антитела не был способен обеспечить достижение уровней фосфорилирования, сравнимых с 8A6. Денситометрическое количественное определение на рентгеновской пленке с использованием программного обеспечения "ImageJ" давало при расчете не более чем 2,8-кратное повышение значений сигналов фосфорилирования, тогда как hu8A6\_N297A приводило к 9,8-кратному повышению по сравнению с необработанными клетками (фиг. 7). Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению явно и неожиданно демонстрируют повышение уровня фосфорилирования ITIM FcγRIIB по сравнению с антителом chGB3\_N297A.

Сравнение эффекта гуманизированного варианта hu8A6, химерного 8A6N297A и chGB3\_N297A в отношении фосфорилирования ITIM в первичных PBMC.

Антитело chGB3\_N297A, ch8A6\_N297A и гуманизированное 8A6 сравнивали по их влиянию на фосфорилирование ITIM FcγRIIB в первичных PBMC человека.

После перекрестного сшивания BCR и FcγRIIB с помощью смеси антител добавляли различные антитела в концентрации 5 мкг/мл и проводили вестерн-блот-анализ в отношении фосфорилирования ITIM. В этом случае антитела также неожиданно оказывали существенно усиленный эффект в отношении фосфорилирования ITIM FcγRIIB по сравнению с антителом, известным из существующего уровня техники (фиг. 8).

Совместная иммунопреципитация фосфорилированного мотива ITIM FcγRIIB и SHIP-1.

После перекрестного сшивания рецепторов фосфатаза SHIP привлекается к мембране посредством связывания ее SH2-домена с фосфотирозином в мотиве ITIM FcγRIIB с последующим фосфорилированием тирозина в мотиве NPXY в С-концевом домене SHIP-1. Релокализация в мембране и последующее фосфорилирование мотива NPXY являются необходимыми для регуляторной функции SHIP-1. Ее эффект в отношении притока кальция, выживания, роста клеток, блокирования клеточного цикла и апоптоза опосредуется путями PI3K и Akt. Tug1021 расположен в одном из мотивов NPXY в SHIP-1, и его фосфорилирование является важным для функции SHIP-1 (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

Клетки Daudi человека стимулировали смесью антител, которая определена в разделе выше, и после лизиса в буфере для мягкого лизиса (буфере для лизиса при CoIP) образцы инкубировали с 2B6 для захвата FcγRIIB. Комплексы связывали с ферромагнитными гранулами с присоединенным белком G и выделяли с помощью магнитного штатива.

Лизаты с  $1 \times 10$  клеток/образец получали в 500 мкл буфера для лизиса при CoIP, инкубируя клетки в течение 30 мин на льду и перемешивая вихревой мешалкой каждые 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин при 4°C и образцы надосадочной жидкости переносили в новые пробирки. 500 мкл лизатов инкубировали с 10 мкг 2B6 в течение 2-3 ч при 4°C при вращении с доньшка на крышку. Магнитные гранулы с присоединенным белком G дважды промывали 500 мкл буфера для лизиса и 50 мкл гранул (1,5 мг) добавляли к комплексам лизат-антитело на ночь при 4°C (на вращающееся колесо). Комплексы элюировали из гранул посредством двукратного промывания 200 мкл буфера для лизиса и нагревания гранул в течение 5 мин в 25 мкл  $1 \times$  буфера LDS для образца, содержащего восстановитель. После центрифугирования при  $4000 \times g$  в течение 30 с к 10 мкл надосадочной жидкости применяли SDS-PAGE для вестерн-блот-анализа.

Вестерн-блот-анализы лизатов продемонстрировали значительно возросшие уровни фосфорилированной SHIP-1 в образцах клеток, обработанных смесью антител и ch8A6\_N297A. Поскольку осаждение осуществляли с антителом 2B6, специфичным к FcγRIIB, совместно осаждалась только выделенная SHIP-1, связанная с FcγRIIB. Мембраны после стрипирования и повторного окрашивания продемонстрировали усиленное фосфорилирование мотива ITIM FcγRIIB в образцах, обработанных ch8A6\_N297A, что коррелировало с сигналами от фосфорилированной SHIP1. При втором повторном окрашивании с помощью α-hFcγRIIB a, b, c (Ab, связывающееся с FcγRII/CD32 человека, поликлональное, IgG козы, R&D Systems, AF1330) были продемонстрированы равные количества осажденного рецептора FcγRIIB во всех образцах, служащих в качестве контроля нагрузки для SDS-PAGE (фиг. 9).

Пример 4. Гуманизация CH8A6 в формате IGG.

Ch8A6 гуманизировали путем трансплантации последовательностей областей, определяющих комплементарность, из антитела крысы на каркасные участки человека. Для выбора каркасных участков человека последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> сравнивали с последовательностями сегментов варибельной и соединяющей области зародышевого типа гена Ig человека, полученными из общедоступных баз данных (IMGT; V-BASE). Последовательности зародышевого типа VH\_3\_30 с IGJ4 человека и последовательности зародышевого типа VK3\_15 с IGKJ2 человека выбирали для тяжелой и легкой цепей соответственно.

Создавали несколько вариантов гуманизованных тяжелой и легкой цепей. Гены, кодирующие разработанные последовательности гуманизованных V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, после этого субклонировали в вектор экспрессии у млекопитающих. Процедуру скрининга вариантов антител осуществляли непосредственно в надосадочной жидкости культуры трансфицированных клеток CHO-S (Invitrogen). Химерное антитело 8A6 служило в качестве контроля трансфекции и стандарта в ходе скрининга гуманизованных вариантов. Варианты Hu8A6 анализировали в отношении связывания на клетках Raji с sFcγRIIB и sFcγRIIA посредством ELISA и с нативным FcγRIIB посредством FACS (см. выше). Кроме того, определение кинетических характеристик вариантов антител осуществляли с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

Тестирование гуманизованных вариантов 8A6.

Для тестирования видов фосфорилирующей активности у гуманизованных вариантов 8A6 клетки Daudi стимулировали смесью антител, обрабатывали 0,5 или 5 мкг/мл различных вариантов 8A6, и проводили вестерн-блот-анализ в отношении фосфорилирования ITIM.

Сравнение гуманизованных вариантов 8A6 с ch8A6\_N297A.

Все тестируемые гуманизованные варианты 8A6 были способны к индукции фосфорилирования рецептора и уровни фосфорилирования были сравнимыми с индуцируемыми ch8A6\_N297A из той же очищаемой партии. Следовательно, не было выявлено потери активности после второго цикла гуманизации. Хотя данные Biacore предполагали различные значения аффинности для различных комбинаций тяжелой и легкой цепей, эти различия нельзя было выявить в вестерн-блот-анализах (фиг. 10).

Сравнение гуманизованных вариантов 8A6 с ch8A6\_N297A, блокирующим антителом, связывающимся с FcγRIIB (2B6), и chGB3\_N297A.

После окончательного выбора комбинации гуманизованных цепей вариант, в котором тяжелая цепь V<sub>H</sub>10 объединена с легкой цепью V<sub>L</sub>6, сравнивали с антителами ch8A6\_N297A, 2B6 и chGB3\_N297A (фиг. 11).

Анализы in vivo.

Модель SLE-PBL.

Rag2/raMma-c/Fcγ-/- мышей облучали в дозе 6 Гр и им инъецировали внутривенно различные количества лейкоцитов периферической крови человека в 500 мкл PBS.

Обработку мышей начинали через 2 недели после инъекции клеток после того, как трансплантацию PBL человека от пациента с SLE мышам подтверждали по наличию hIgM или hIgG. Мышей обрабатывали путем внутривенного введения 200 мкл буфера (PBS) или 20 мкг антитела (ch8A6\_N297A) в 200 мкл PBS дважды в неделю в течение 4 недель. Мышей взвешивали, и у них отбирали кровь для получения сыворотки крови один раз в неделю. Образцы сыворотки крови замораживали при -80°C до дальнейшего использования (фиг. 12).

ELISA.

Образцы сыворотки крови анализировали с помощью ELISA на наличие общего IgG, IgM человека и антител IgM и IgG к ДНК.

Для количественного определения общего сывороточного IgM и IgG в образцах сыворотки крови использовали набор для количественного определения IgM человека с помощью ELISA от Bethyl и набор для количественного определения IgG человека с помощью ELISA (Biomol) в соответствии с инструкциями производителя. OD измеряли с использованием настраиваемого микропланшетного ридера VersaMax (Molecular Devices) при длине волны 450 и 650 нм.

Для выявления антител к ДНК планшеты для ELISA покрывали 10 мкг/мл метилированного BSA (Sigma) в PBS на 2 ч при комнатной температуре. После промывки планшеты покрывали 50 мкг/мл ДНК

тимуса теленка (Sigma) в PBS при 4°C на ночь. Блокирование неспецифического связывания осуществляли смесью PBS/0,1% желатин/3% BSA/1 mM EDTA в течение 2 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови разводили 1:100 в блокирующем растворе и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве детекторного антитела использовали конъюгированное с HRP антитело из набора для количественного определения IgM человека (Bethyl), и его разводили 1:10000 в блокирующем растворе с последующим инкубированием в течение 1 ч при комнатной температуре. PBS использовали для всех этапов промывки. Для выявления добавляли раствор ТМВ, и реакцию останавливали 6% ортофосфорной кислотой.

Модель SLE-PBL, общий сывороточный иммуноглобулин человека.

Анализировали уровни общего IgG человека [мкг/мл] у мышей, которым трансплантировали PBL от доноров-людей, страдающих SLE. Значительных различий в уровне общего IgG человека между PBS и антителом, связывающимся с FcγRIIB, выявлено не было. Антитело согласно настоящему изобретению не оказывало значительного влияния на уровень общего IgG человека (фиг. 13).

Модель SLE-PBL, влияние на антитела к ДНК (IgG, специфичный для конкретного заболевания).

Существенное снижение уровня специфичного для конкретного заболевания антитела IgG человека к ДНК у мышей, обработанных антителом, связывающимся с FcγRIIB, наблюдали, начиная с 4 недели после переноса/трансплантации SLE-PBL. Раскрытые антитела специфично снижают количество связанных с заболеванием антител к ДНК (фиг. 14).

Пример 5. Образование биспецифического антитела, связывающегося с Fc-гамма-рецептором IIВ и Fc-эпсилон-рецептором.

Определение номенклатуры конструкторов 8A6-IgG и 8A6-IgE:

химерные:

8A6-IgG	ch8A6_N297A
8A6_сє2-4	ch8A6_сє2-4
дегликозилированное 8A6_сє2-4	ch8A6_сє2-4- degly
8A6_сє3-4	ch8A6_сє3-4
дегликозилированное 8A6_сє3-4	ch8A6_сє3-4-degly
дегликозилированное 8A6_сє2-4, полученное от Trenzyme	ch8A6_сє2-4-degly_T
дегликозилированное 8A6_сє3-4, полученное от Trenzyme	ch8A6_сє3-4-degly_T

гликолизированные:

8A6_сє2-4	hu8A6_сє2-4
дегликозилированное 8A6_сє2-4	hu8A6_сє2-4- degly
8A6_сє3-4	hu8A6_сє3-4

Описание создания, экспрессии и очистки различных антител на основе IgE, связывающихся с FcγRIIB.

Разработка конструкторов.

Как изображено на фиг. 15, для всех конструкторов общим является то, что Fab-домен гибридного антитела эквивалентен молекуле IgG (вариабельному домену и CL-/CH1-домену). Более того, все конструкторы имеют константные Cє3- и Cє4-домены IgE. Эти домены гомологичны Cg2 и Cg3 IgG. В антителе IgG шарнирная область отвечает за необходимую гибкость антитела и образование димера посредством дисульфидных мостиков. Эта шарнирная область отсутствует в антителе IgE. Вместо шарнирной области эту функцию принимает на себя дополнительный Cє2-домен. Антитело 8A6-IgE характеризуется высокой гибкостью Fab-домена наряду с оптимальной перестройкой Cg1-домена в Cє-домен. Ввиду этого были разработаны варианты, содержащие шарнирную область IgG (см. фиг. 15) либо полный Fcє-домен (Cє2, Cє3, Cє4) IgE (см. фиг. 15). Другой тип изменчивости касается разного количества участков N-гликозилирования в Fcє-домене. Гликозилирование Fc-домена IgE не влияет на аффинность к FcєRI, но влияет на экспрессию и стабильность антитела. Эти конструкторы клонировали в плазмидные векторы в соответствии со стандартными лабораторными процедурами.

Линии клеток и условия культивирования.

Клетки CHO-S культивировали в соответствии с рекомендациями поставщика. Вкратце, клетки культивировали в среде Freestyle для CHO-S, дополненной 2 мМ GlutaMax, и пересевали каждые 2-3 дня. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 об/мин. За один день до трансфекции клетки разделяли при плотности  $0,5 \times 10^6$ /мл и проверяли жизнеспособность (> 96%).

Линии клеток лимфомы Беркитта человека Raji и Daudi культивировали в RPMI 1640, дополненной 10% FBS, NEAA MEM, 1 мМ пирувата натрия и 2 мМ L-глутамин, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пересевали каждые 2-3 дня при плотности  $0,2-1,0 \times 10^6$  клеток/мл.

Трансфекция CHO-S конструктами FcγRIIbIgE.

В день трансфекции плотность клеток составляла  $1,0-2,0 \times 10^6$  /мл.  $8,0 \times 10^6$  клеток разводили в 20 мл среды Freestyle для CHO ( $40 \times 10^6$  /мл). Добавляли 1000 мкг плазмидной ДНК (по 500 мкг для каждой из тяжелой и легкой цепей) (50 мкг ДНК/мл объема трансфекционной смеси) с последующим добавлением 2000 мкг PEI (100 мкг PEI/мл объема трансфекционной смеси). Клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 об/мин. После этого суспензию клеток разводили 1:10 в среде Freestyle для CHO, добавляли 0,5 мМ вальпроевой кислоты и инкубировали при 31°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 об/мин в течение 10 дней. Образцы надосадочной жидкости собирали путем центрифугирования в течение  $2 \times 10$  мин при  $4000 \times g$ .

Определение титра, очистка и эксклюзионная хроматография.

Определение титра антител посредством HPLC с белком А.

Анализ по методу HPLC с белком А проводили с использованием системы HPLC серии Agilent 1200. Данные анализировали с помощью программного обеспечения "ChemStation" модифицированной версии В.04.02. Применяли следующие растворители: растворитель А: 0,05 М Tris/HCl, 0,1 М глицин, 0,15 М NaCl, pH 8,0; растворитель В: 0,05 М Tris/HCl, 0,1 М глицин, 0,15 М NaCl, pH 3,0. Для анализа в аналитическую предколонку Upchurch (№ С-130В) размером  $2 \times 20$  мм упаковывали 120 мкл среды для перфузионной хроматографии Applied Biosystems Poros® 20A (Life Technologies, № 4374732). Связанное антитело элюировали 100% растворителя В. В случае, когда собирали очищенное антитело, фракции нейтрализовали с помощью 56 мМ Tris с pH 8,0.

Очистка 8A6-IgE.

После шести дней культивирования клетки собирали, и путем центрифугирования в течение  $2 \times 10$  мин при  $4000 \times g$  получали образцы надосадочной жидкости, содержащие антитела. Антитела очищали с помощью колонки HiTrap на 5 мл с белком А FF (GE Healthcare) посредством жидкостной экспресс-хроматографии белков (Åkta Explorer). Связывание антитела с белком А опосредовано его каркасным участком VH3. Подвижный буфер содержал 10 мМ Tris-HCl с pH 8,0, 150 мМ NaCl, элюирующий буфер содержал 100 мМ глицина с pH 2,7, 150 мМ NaCl. Элюированные антитела нейтрализовали 60 мМ Tris-HCl с pH 8,0, концентрировали (Sartorius Vivaspin4) до примерно 1,0 мг/мл, подвергали стерилизующей фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при -80°C.

Пример 6. Определение характеристик химерных конструктов 8A6-IgE.

Эксклюзионная HPLC.

С целью определения олигомерного состояния и однородности очищенных вариантов 8A6-IgE к образцам применяли SE-HPLC. SE-HPLC проводили с использованием системы HPLC серии Agilent 1200. Данные анализировали с помощью программного обеспечения "ChemStation" модифицированной версии В.04.02. Анализ проводили с помощью колонки Superdex200 10/300 GL (GE Healthcare). Применяли следующий растворитель: 5 мМ His, 150 мМ NaCl, pH 6,5. Применяли 25 мкг белка в концентрации 0,5 мкг/мкл.

В этом случае было выявлено, что гликозилированные варианты 8A6-IgE могут быть склонны к образованию большего числа димеров по сравнению со стандартным ch8A6\_N297A, тогда как дегликозилированные 8A6-IgE, по-видимому, были в большей степени расщепленными и характеризовались более высокой процентной долей фрагментов по сравнению со стандартным ch8A6\_N297A.

Анализы связывания.

Осуществили несколько анализов связывания для анализа аффинности связывания и специфичности антител. Для этих анализов связывания растворимый FcεRIα получали в соответствии с нижеприведенным протоколом.

Получение растворимого FcεRIα.

Трансфекция CHO-S с помощью sFcεRIα.

В день трансфекции плотность клеток составляла  $\sim 1,0 \times 10^6$ /мл. 500 мл суспензии клеток переносили в две 1-литровые колбы. Реагент Freestyle Max осторожно переворачивали и 312,5 мкл разводили в 5 мл Optipro SFM (при комнатной температуре). 312,5 мкг плазмидной ДНК (pAC91, sFcεRIα-H6) (SEQ ID NO: 37) разводили в 5 мл Optipro SFM и осторожно перемешивали. Разведенный реагент Freestyle Max добавляли к смеси ДНК/Optipro SFM и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. К клеткам медленно добавляли смесь ДНК-липид, при этом медленно вращая колбу. Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 об/мин в течение 6 дней. Образцы надосадочной жидкости

собирали путем центрифугирования в течение  $2 \times 10$  мин при  $4000 \times g$ .

Очистка sFcεRIα.

Для получения рекомбинантного растворимого FcεRIα клетки CHO-S трансфицировали внеклеточным доменом FcεRIα человека (pAC91) с His-меткой согласно описанному. Очистку sFcεRIα от надосадочной жидкости культуры клеток проводили путем очистки с помощью NiNTA (Qiagen, № 1018244) с использованием Äkta Explorer. Применяли следующие буферы: буфер для связывания, содержащий 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM имидазола, pH 8,0; элюирующий буфер, содержащий 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 400 mM имидазола, pH 8,0. Связанный sFcεRIα элюировали в линейном градиенте от 0 до 100% В. После концентрирования фракций sFcεRIα проводили замену буфера на 10 mM His, pH 6,5. За этим следовала очистка sFcεRIα с помощью хроматографии в режиме слабого анионного обмена с DEAE-сефарозой FF (GE Healthcare, № 17-0709-10) с использованием Äkta Explorer. Растворитель А содержал 10 mM His с pH 6,5; растворитель В содержал 10 mM His, 0,5 mM NaCl с pH 6,5. Связанный sFcεRIα элюировали в линейном градиенте от 2 до 100%.

В. Концентрированный белок хранили в 10 mM His, 150 mM NaCl с pH 6,5 при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

SDS-PAGE.

Для анализа по методу SDS-PAGE 1 мкг очищенного антитела или материала от Trenzyme вносили в гель NuPAGE Bis-Tris (4-12%). Антитела вносили в буфер LDS для образца NuPAGE, в который в восстанавливающих условиях также добавляли восстановитель для образца с предварительным нагреванием до  $75^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин в соответствии с рекомендациями производителя. SDS-PAGE осуществляли с постоянной мощностью при 200 В в течение 30 мин. После этого гели дважды промывали в H<sub>2</sub>O и окрашивали с помощью окрашивающего раствора SimplyBlue (Life Technologies). Удаление избытка красителя происходило в H<sub>2</sub>O и визуализацию гелей проводили с помощью трансиллюминатора (УФ, белый свет).

Анализ связывания с помощью ELISA.

Связывание 8A6-IgE с sFcγRIIB или sFcεRIα.

Для тестирования эффективности связывания антител 8A6\_ε2-4/8A6\_ε3-4 в гликозилированном и негликозилированном формате как с sFcγRIIB, так и с sFcεRIα осуществляли анализ по методу ELISA. С этой целью 96-луночные планшеты покрывали SM101 или sFcεRIα, 1 мкг/мл в PBS (объем 100 мкл), на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 2 раза в PBS, 0,01% Tween®-20 и блокировали в PBS, 2% BSA, 250 мкл/лунка в течение 2 ч при комнатной температуре. После этапа промывки образцы антител добавляли в соответствующих серийных разведениях в PBS, 2% BSA в покрытые лунки на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза в PBS, 0,01% Tween®-20, и добавляли конъюгированное с HRP вторичное детекторное антитело, направленное на легкую каппа-цепь человека, в разведении 1:8000 в PBS, 2% BSA, на 1 ч при комнатной температуре. После трех этапов промывки связанное антитело, конъюгированное с HRP, выявляли с помощью OPD, 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 мкл/лунка. Реакцию останавливали с помощью 50 мкл 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и поглощение измеряли при 492 нм с помощью ридера для ELISA (Tecan, Spectra FluorPlus). При прямом связывании с sFcγRIIB было выявлено, что все четыре конструктора 8A6\_IgE характеризовались такой же аффинностью к sFcγRIIB, как и антитело ch8A6\_N297A (фиг. 16), ввиду наличия общего Fab-домена. Однако при связывании конструкторов 8A6-IgE с sFcεRIα были продемонстрированы различия между конструкторами с Fc-частью IgE полной длины (ε2-4) и более короткими версиями (ε3-4) (фиг. 17).

Связывание 8A6-IgE с sFcγRIIB и sFcεRIα - сэндвич-ELISA.

Сэндвич-ELISA осуществляли для того, чтобы показать одновременное связывание с обоими антигенами. Эффективность связывания полученных вариантов 8A6\_ε2-4/8A6\_ε3-4 как с sFcγRIIB, так и с sFcεRIα в качестве мишеней тестировали в данном анализе по методу сэндвич-ELISA. С этой целью 96-луночные планшеты покрывали растворимым FcγRIIB (SM101), 1 мкг/мл в PBS (объем 100 мкл), на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 2 раза в PBS, 0,01% Tween®-20 и блокировали в PBS, 2% BSA, 250 мкл/лунка в течение 2 ч при комнатной температуре. После этапа промывки образцы антител добавляли в соответствующих серийных разведениях в PBS, 2% BSA в покрытые лунки на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза в PBS, 0,01% Tween®-20 и инкубировали с sFcεRIα, 0,005 мкг/мл в PBS, 2% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза в PBS, 0,01% Tween®-20, и добавляли вторичное биотинилированное детекторное антитело CRA1, направленное на FcεRIα человека, в концентрации 0,5 мкг/мл, разведенное в PBS, 2% BSA, на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза в PBS, 0,01% Tween®-20, и добавляли стрептавидин, конъюгированный с HRP, в разведении 1:200 в PBS на 20 мин при комнатной температуре. После трех этапов промывки, связанный стрептавидин, конъюгированный с HRP, выявляли с помощью OPD, 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 мкл/лунка. Реакцию останавливали с помощью 50 мкл 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и поглощение измеряли при 492 нм с помощью ридера для ELISA.

Сэндвич-ELISA подтверждал результаты, полученные в ELISA. В этом случае также была продемонстрирована низкая аффинность конструкторов 8A6\_ε3-4 к FcεRIα при одновременном связывании Fab-

фрагмента антитела с Fc $\gamma$ RIIB.

Анализ связывания с помощью FACS.

Связывание антитела с поверхностью клеток, экспрессирующих нативный Fc $\gamma$ RIIB, определяли посредством FACS-анализа. Применяли клетки Raji, так как данная линия клеток-B-лимфоцитов, полученная из лимфомы Беркитта, экспрессирует Fc $\gamma$ RIIB на высоких уровнях. Клетки Raji осаждали, и  $1,0 \times 10^5$  клеток/лунка высевали в 96-луночные круглодонные планшеты для культур клеток в 50 мкл буфера для FACS (HBSS, 5% FBS, 0,01% NaN<sub>3</sub>). Подлежащие тестированию антитела вносили к клеткам Raji в соответствующих серийных разведениях в 50 мкл буфера для FACS и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. После двух этапов промывки с помощью 200 мкл буфера для FACS клетки инкубировали с конъюгированным с FITC вторичным антителом, направленным на легкую каппа-цепь человека (Fab)<sub>2</sub>, разведенным 1:200 в буфере для FACS, в течение 30 мин при 4°C. После двух этапов промывки клеточные осадки ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием FACS Canto II (BD Biosciences).

Анализ показал, что для всех вариантов 8A6 связывающая способность Fab-фрагментов в отношении Fc $\gamma$ RIIB остается сравнимой с ch8A6\_N297A независимо от изменений, внесенных в Fc-часть антитела (фиг. 18).

Biacore.

Аффинность конструкторов антител по отношению к Fc $\gamma$ RIIB и Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  дополнительно анализировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением системы Biacore™ T200.

SFc $\gamma$ RIIB ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 серии S (Biacore, BR-1005-30) с применением стандартного протокола сочетания с аминокислотами (BIAensor Surface Handbook, Biacore). Варианты антител захватывали в концентрации 50 нМ в течение 1 мин. Аналит sFc $\epsilon$ RI $\alpha$  инъецировали в различных концентрациях 0,1-25 нМ в течение 3 мин с последующим этапом диссоциации в течение 7 мин. Чип CM5 регенерировали с помощью буфера, содержащего 3 М MgCl<sub>2</sub>, путем прекращения взаимодействия лиганда и SM101, подготавливая его таким образом для нового цикла анализа. Измерения проводили при 25°C и в непрерывном потоке (10 мкл/мин). Оценивание данных проводили с применением программного обеспечения для оценки Biacore T200 (версии 1.0), предполагая связывание 1:1.

#### Краткое описание экспериментов по связыванию

Обнаружили, что аффинность связывания всех конструкторов к Fc $\gamma$ RIIB была равна аффинности исходного антитела IgG. Что касается связывания с Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ , результаты определения характеристик связывания 8A6-IgE с обоими антигенами позволяют предположить, что укороченные варианты 8A6\_с $\epsilon$ 3-4/degly могут не проявлять такую же высокую аффинность к Fc $\epsilon$ RI, как конструкторы IgE полной длины.

Пример 7. Получение и определение характеристик гуманизованных антител 8A6-IgE.

Гуманизация 8A6-IgE.

Для гуманизации ch8A6-IgE переменную область тяжелой цепи антитела заменяли гуманизованной переменной областью тяжелой цепи 10 (VH10) с SEQ ID NO: 3. Переменную область легкой цепи 6 (VL6; SEQ ID NO: 4) применяли вместе с гуманизованными тяжелыми цепями для экспрессии гуманизованных конструкторов 8A6-IgE.

Замену переменной области тяжелой цепи проводили посредством стандартной процедуры клонирования. Замена переменной области тяжелой цепи происходила посредством стандартной процедуры клонирования.

Правильное встраивание вставок подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Кроме того, C-концевой лизин последовательности тяжелой цепи удаляли и заменяли стоп-кодоном (AAA → TAA). Это значительно уменьшало количество вариантов с разными зарядами. Это было осуществлено путем мутагенеза с помощью ПЦР, и успешную мутацию подтверждали с помощью секвенирования.

Определение характеристик связывания гуманизованных 8A6-IgE с антигеном с помощью ELISA.

ELISA осуществляли с применением такого же протокола, как в примере 2. Связывание вариантов hu8A6-IgE тестировали в сравнении с ch8A6\_N297A. В данном случае не было выявлено различий в аффинности связывания в отношении растворимого Fc $\gamma$ RIIB (фиг. 19). Тестировали связывание гуманизованных и химерных вариантов 8A6-IgE с sFc $\epsilon$ RI $\alpha$  с помощью их Fc-части. Оба варианта 8A6-IgE с укороченной Fc-частью (с $\epsilon$ 3-4), химерный и гуманизованный, продемонстрировали более низкую аффинность в отношении Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  по сравнению с вариантами 8A6-IgE с полной Fc-частью (с $\epsilon$ 2-4). Однако между химерными и гуманизованными антителами не было выявлено различий (фиг. 20).

Пример 8. Мечение 8A6-IgE и кинетика его связывания с моноцитами периферической крови (PBMC).

Исследования связывания с Fc $\epsilon$ RI проводили с конструктором ch8A6\_с $\epsilon$ 2-4 полной длины в его дегликозилированной версии.

Способы.

8A6 (IgE) и (IgG) метили флуоресцентным красителем NHS-Fluo488.

500 мкг каждого антитела обессоливали в PBS с применением колонки PD-10 в соответствии с инструкциями изготовителя. Поглощение для элюированных фракций измеряли фотометром при 280 нм (эталон: 320 нм), и фракции, содержащие наибольшее количество антител, объединяли. После концентрирования с применением колонок Vivaspin4 можно получить обратно примерно 400 мкг антител.

Флуоресцентный краситель Fluo488 восстанавливали в DMSO и его концентрацию рассчитывали путем измерения флуоресценции при его максимуме испускания при 517 нм.

Антитело и краситель смешивали в молярном соотношении 1:10, при этом краситель медленно добавляли к раствору антитела при перемешивании образца вихревой мешалкой. Точные расчеты количества антитела и красителя можно найти в приложении. Раствор инкубировали в течение 1 ч при 25°C при постоянном встряхивании при 300 об/мин (Eppendorf ThermoMixer). Свободные молекулы красителя отделяли путем очистки с применением колонки PD-10. Фракции с наибольшим количеством меченого белка, измеренным при 280 нм (антитело) и 510 нм (краситель), объединяли, вновь концентрировали с применением колонок Vivaspin4, и рассчитывали конечную концентрацию и степень мечения (D.O.L.).

Для меченых антител проводили расчет конечных показателей:

$$\text{ch8A6}_{\text{с}2-4\text{-degly-T}}: 1,35 \text{ мкг/мкл, D.O.L.: } 2,2$$

$$\text{ch8A6}_{\text{с}3-4\text{-degly-T}}: 1 \text{ мкг/мкл, D.O.L.: } 2,86$$

Расчет количеств флуоресцентного красителя и антитела.

Молекулярная масса 8A6 (IgE): примерно 176000 Да = 176000 г/моль.

350 мкг антитела = 2 нмоль.

Молекулярная масса Fluo488: примерно 981 моль/л.

Ресуспендирование неопределенного количества в DMSO.

Разведение 1:5000 в воде и измерение OD<sub>517</sub> (максимум испускания красителя).

Концентрация [мкг/мкл] = коэффициент разведения × OD<sub>517</sub> × 918/80000 = 8,6 нмоль/мкл.

Расчет соотношения красителя и антитела.

Желательное молярное соотношение краситель:антитело = 10:1.

2 нмоль антитела → 20 нмоль красителя.

2,3 мкл красителя.

Расчет степени мечения (D.O.L.).

Определения для расчета концентрации и D.O.L. белка.

$A_{\text{max}}$  = поглощение при максимуме испускания красителя, 517 нм для Fluo488.

$A_{280}$  = поглощение при 280 нм (белок).

CF = поправочный коэффициент; определяемый Interchim конкретно для каждого красителя, связанного с белком;  $A_{280}$  (свободный краситель)/ $A_{\text{max}}$  (свободный краситель).

MW: молекулярная масса белка.

$\epsilon$ : коэффициент экстинкции.

$$c[\text{белок}] = 1,4 \times (A_{280} - A_{\text{max}} \times \text{CF})$$

$$\text{D.O.L.} = (A_{\text{max}} \times \text{MW}) / (c[\text{белок}] \times \epsilon_{\text{краситель}})$$

Получение PBMC посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколла.

Лейкоцитарные пленки от здоровых доноров разводили 1:1 в HBSS и 30 мл наносили слоем на 15 мл раствора для разделения Biocoll в пробирке Falcon на 50 мл. После центрифугирования при 1000 × g в течение 20 мин без остановки фракцию лейкоцитов собирали пластиковой пипеткой. Клетки дважды промывали полной средой для роста и подсчитывали в счетной камере Нойбауэра.

Кинетика связывания ch8A6<sub>с2-4-degly-T</sub> и ch8A6<sub>N297A</sub> на PBMC.

0,5 × 10<sup>6</sup> PBMC в 100 мкл полной среды для роста инкубировали в 96-луночном планшете (плоскодонном) в инкубаторе при 37°C со следующими разведениями антител: 2 мкг/мл ch8A6<sub>с2-4-degly-T</sub>-cFluo488, 2 мкг/мл ch8A6<sub>N297A</sub>-Fluo488, 2 мкг/мл 8A6<sub>с2-4-degly-T</sub>. Для каждого момента времени была приготовлена дополнительная лунка. В качестве контроля связывание с FcγRIIB на PBMC блокировали посредством предварительного инкубирования ch8A6<sub>с2-4-degly-T</sub>-Fluo488 с 5-кратным молярным избытком SM101 в течение 30 мин при комнатной температуре. Блокирование FcγRIIB-связывающего участка тестировали на клетках Raji посредством FACS-анализа после инкубирования.

Через 10, 30, 60, 120 и 240 мин, а также после инкубирования в течение ночи клетки осаждали центрифугированием при 400 × g в течение 5 мин и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего 2,5 мкл α-hCD19-PerCy7, 5 мкл α-hCD63-PerCP и 2,5 мкл α-hCD193-APC, в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин на льду. После двух этапов промывки буфером для FACS образцы анализировали с использованием FACS Canto II.

Связывание меченых Fluo488 8A6-IgG и 8A6-IgE с клетками Raji.

Клетки Raji инкубировали с различными концентрациями меченого антитела и средние значения флуоресценции наносили на график в зависимости от концентраций антител. Антитело 8A6\_сe2-4-degly демонстрировало высокую аффинность связывания со своим рецептором FcγRIIB на поверхности клеток Raji (см. фиг. 21). Специфичность этого связывания подтверждали в анализе клеток CHO, которые инкубировали с тем же конструктором, где не было выявлено поверхностных сигналов от меченого антитела, что и ожидалось, так как у клеток CHO отсутствует рецептор FcεRI. Эти данные подтвердили, что связывание антитела не изменялось в ходе всего процесса мечения или благодаря применению связанного флуорохрома NHS-Fluo488.

Маскировка FcγRIIB-связывающего участка 8A6\_сe2-4-degly с помощью SM101 в качестве контроля.

Для обеспечения выявления связывания Fc-части 8A6-IgE с клетками F(ab)2-домен и соответственно FcγRIIB-связывающий участок блокировали посредством предварительного инкубирования антитела с SM101. Связывающую способность конструкторов анализировали с помощью FACS. FACS-анализ четко продемонстрировал блокирование связывания 8A6\_сe2-4-degly со своим рецептором FcγRIIB после предварительного инкубирования с 5-кратным молярным избытком растворимого рецептора (SM101). Среднее значение флуоресценции после предварительного инкубирования с SM101 уменьшилось до 11,8% по сравнению с необработанным антителом. Таким образом, маскированное антитело 8A6\_сe2-4-degly можно применять в качестве контроля для инкубирования PBMC.

Кинетика связывания на PBMC.

Связывание антитела 8A6-IgE, меченого Fluo488, на выделенных PBMC оценивали посредством FACS-анализа. Таким образом, клетки окрашивали с помощью α-hCD193-APC и α-hCD193-PerCPy7 для проведения различий между В-клетками (CD 19) и базофилами (CD 193, низкое значение SSC). CD63 окрашивали для анализа активации базофилов.

Экспрессия CD63 на базофилах в ходе измерений не изменялась (не показано).

На фиг. 22 показаны флуоресцентные сигналы на В-клетках, выявляемые с помощью антитела с α-hCD193-PerCPy7. Зеленые цифры отображают измеренные средние значения флуоресценции CD19-положительных клеток для антител, меченных Fluo488.

Пример 9. Тест активации базофилов (BAT).

В основе анализа лежит способ, впервые описанный Sainte-Laudy и соавт. в 1994 г. (Sainte-Laudy, J., et al., Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. Allerg. Immunol. (Paris) 26, 211-4 и 1996 г. (Sabbah, A. and Sainte-Laudy, J., Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. ACI International 8, 116-9), где активацию базофилов аллергенами или контролями выявляли с помощью проточной цитометрии, измеряя повышенные экспрессии CD63 (gp53) на поверхности клеток. Аллергены и положительные контроли добавляли к гепаринизированной цельной крови, и поверхностную экспрессию CD63 измеряли посредством специфического окрашивания антителами, включающими в себя антитело к hCD193 для идентификации базофилов и антитело к hCD63 для измерения активации. Параллельно можно измерять высвобождение гистамина в качестве второго параметра для активации и дегрануляции базофилов.

Благодаря перекрестному сшиванию FcγRIIB и FcεRI с помощью 8A6-IgE на поверхности базофилов клеточная реакция на аллерген, опосредованная FcεRI, снижалась.

Получали 50 мкл гепаринизированной цельной крови от доноров, о которых было известно, что они имели аллергию на пыльцу (или другую определенную форму аллергии на доступный для исследования аллерген).

В данных экспериментах антитело ch8A6\_сe2-4-degly применяли в сравнении с химерным 8A6 (IgG) с мутацией N297A ch8A6\_N297A.

Для положительного и отрицательного контролей время инкубирования с аллергеном или контролями, составляющее 15 мин, было достаточным для надлежащей активации базофилов, как описано в руководстве к набору.

50 мкл гепаринизированной цельной крови инкубировали с 50 мкл раздражителя (аллергена, fMLP или контрольного антитела к FcεRI) и 100 мкл буфера для стимуляции. α-FcεRI и fMLP растворяли согласно описанию в руководстве к набору и применяли неразведенными. Аллергены разводили 1:5 в буфере для стимуляции. Готовили буфер и раздражитель в пробирках типа Falcon, и к этому раствору непосредственно добавляли 50 мкл образца крови без контакта со стенками пробирки. Добавляли 20 мкл окрашивающего реагента или коммерчески доступных антител (α-hCD63-PE и α-hCD193-Alexa647), растворенных в буфере для стимуляции. Образцы осторожно перемешивали вихревой мешалкой и инкубировали на водяной бане, подогретой до 37°C, в течение 15 мин. Для лизиса в каждую пробирку вносили 2 мл лизирующего реагента, затем образцы перемешивали вихревой мешалкой и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. После центрифугирования при 500 × g в течение 5 мин образцы надосадочной жидкости удаляли, и осадки ресуспендировали в 300 мкл промычного буфера из набора. FACS-анализ осуществляли на FACS Canto II с применением следующих параметров:



FSC линейная шкала напряжение: 269

SSC линейная шкала напряжение: 401

FITC логарифмическая шкала напряжение: 447

PE логарифмическая шкала напряжение: 379

Антитело  $\alpha$ -Fc $\epsilon$ RI и пептид fMLP (формилметиониллейцилфенилаланин, SEQ ID NO: 38) содержались в наборе и применялись в количестве 50 мкл на образец.

Стратегия гейтирования.

На фиг. 23 показана стратегия гейтирования в лизированной цельной крови. Параметры FSC и SSC устанавливали линейными. Были видны три популяции: лимфоциты, моноциты и гранулоциты. Базофилы можно было выявить на том же уровне SSC, что и лимфоциты. Откладывание на графике экспрессии CD 193 в зависимости от SSC приводит к выявлению двух отдельных популяций, экспрессирующих CD 193. Популяцию с низким значением SSC идентифицировали как базофильные гранулоциты. На графике, на котором показана экспрессия CD 193 (ось Y) в сравнении с CD63 (ось X), использовали квадрантные гейты, так что флуоресценция CD63 в необработанных образцах была фактически равной нулю.

Проводили дополнительное определение характеристик популяций клеток с применением стратегии обратного гейтирования.

На гейты, содержащие популяцию с низким уровнем экспрессии CD63 и популяцию с высоким уровнем экспрессии CD63, накладывали график FSC-SSC для негейтированного лизата цельной крови. Было обнаружено, что популяция с низким уровнем экспрессии располагалась возле популяции лимфоцитов, что подтверждало то, что эта гейтированная популяция представляла собой базофилы. В противоположность этому, популяция с высоким уровнем экспрессии находилась на самом правом краю по оси SSC, что отображает то, что эти клетки были высокогранулярными и представляли собой эозинофильные гранулоциты.

Экспрессия CD63 у положительных и отрицательных контролей.

Экспрессию CD63 в необработанных клетках принимали равной 0%, иными словами, только очень немногие положительные клетки в нижнем квадранте квадрантного гейта были установлены как базофилы. Антитело  $\alpha$ -Fc $\epsilon$ RI воспроизводимо активировало базофилы до уровней в 90% CD63-положительных клеток, тогда как пептид fMLP индуцировал лишь умеренную экспрессию CD63 при 25-30% положительных клеток.

Для определения того, могут ли антитела, которые подлежат тестированию в отношении их способности ослаблять аллергическую реакцию, активировать базофилы сами по себе, ch8A6\_N297A и ch8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly вводили в двух разных концентрациях без дополнительной активации клеток.

На фиг. 24 показаны полученные данные для этих образцов.

Инкубирование образцов цельной крови с 0,5 или 2 мкг/мл 8A6-IgG или 8A6-IgE не активировало базофилы само по себе, как показано на верхнем чертеже. Поверхностная экспрессия CD63 не изменялась, и в двух независимых экспериментах выявили менее 1% положительных клеток.

На следующем этапе анализа исследовали эффект примесей эндотоксинов в отношении активации базофилов. Поскольку 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly содержит ~30 EU/мл эндотоксина, что обусловлено способом получения, то для исключения эффектов, проистекающих от материала с примесями, проводили контрольный эксперимент с LPS. Таким образом, отдельный образец крови инкубировали с 50 EU/мл LPS (разведенного 1:4 в анализе) параллельно с 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly в отдельности. Как показано на фиг. 25, обработка базофилов с помощью LPS в концентрациях, ожидаемых при получении с примесями, не приводила к неспецифической активации клеток. Таким образом, эффекты, измеренные после обработки с помощью 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly, могут напрямую коррелировать с активностью антитела.

Превентивная обработка базофилов с помощью 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly.

Образцы цельной крови инкубировали с контролями, 8A6N297A и 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly в различных концентрациях. Образцы отбирали в различные моменты времени, и измеряли потенциал базофилов к активации пылью.

А) Момент времени 0 ч.

Непосредственно после добавления соответствующих антител к аликвотам цельной крови отбирали первые образцы для момента времени 0, и их потенциал к активации анализировали посредством стимуляции пылью. В данный момент времени проводили измерения в двух независимых экспериментах. В этот момент времени, отражающий приблизительно 5 мин инкубирования с антителами (время от пипетирования до инкубирования образца), не наблюдали эффектов 8A6N297A или 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly. Базофилы во всех образцах могли быть активированы пылью до получения приблизительно 90% клеток, экспрессирующих CD63.

В) Момент времени 2 ч.

После 2 ч инкубирования выявляли активацию базофилов без потери активности, что видно по ак-

тивации с помощью  $\alpha$ -Fc $\epsilon$ RI (92% положительных клеток) и стимуляции пылью необработанных клеток (93,4%).

Инкубирование с 8A6\_N297A в концентрациях в диапазоне от 0,5 до 5 мкг/мл не влияло на активацию базофилов пылью (значения от 91 до 91,6% положительных клеток). В этот момент времени уровень активации базофилов, по-видимому, снижался в образцах, которые были обработаны с помощью 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly (84,4-88%), несмотря на то, что дозозависимость не была выявлена.

С) Момент времени 6 ч.

После 6 ч инкубирования потенциал клеток к активации положительными контролями уменьшался до приблизительно 85% для активации пылью и 87% для обработки с помощью  $\alpha$ -Fc $\epsilon$ RI (фиг. 26). В то время как при обработке с помощью 8A6-IgG демонстрировались результаты, сравнимые с положительными контролями (85-88%), клетки, которые инкубировали с 8A6-IgE, демонстрировали уменьшение потенциала к активации (76-84%) (фиг. 27). После инкубирования с 0,5 мкг/мл 8A6\_с $\epsilon$ 2-4-degly только 76,6% базофилов могли быть активированы пылью. Тем не менее дозозависимость выявлена не была, и для более высокой дозы демонстрировалось незначительное повышение экспрессии CD63 по сравнению с обработкой при 0,5 мкг/мл.

D) Момент времени 24 ч.

В последний момент времени, измерения в который проводили в двух независимых экспериментах, демонстрировалось снижение активации для обработки  $\alpha$ -Fc $\epsilon$ RI до 75% экспрессии CD63 (фиг. 28 и 29).

Пример 10. Тест активации пылью.

Гепаринизированную цельную кровь от здорового донора, результат тестирования которого на пылевую атопию был положительным, инкубировали в течение ночи с 5 мкг/мл дегликозилированного 8A6\_с $\epsilon$ 2-4 или дегликозилированного 8A6\_с $\epsilon$ 3-4 (SM301 с $\epsilon$ 2-4 или с $\epsilon$ 3-4) соответственно. Для анализа 50 мкл образца крови смешивали с 50 мкл пыли (предварительно разведенной 1:5 в буфере для стимуляции), 100 мкл буфера для стимуляции (набор FlowCast) и 20 мкл окрашивающего раствора (3 мкл  $\alpha$ -hCD193-Alexa647, 3 мкл  $\alpha$ -hCD63-PerCP, 3 мкл  $\alpha$ -hCD203c-PE, 11 мкл буфера для стимуляции). Образцы осторожно перемешивали вихревой мешалкой и инкубировали на водяной бане, подогретой до 37°C, в течение 15 мин. Для лизиса в каждую пробирку вносили 2 мл реагента PharmLyse (BD Biosciences), затем образцы снова перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. После центрифугирования при 500  $\times$  g в течение 5 мин образцы надосадочной жидкости удаляли и осадки ресуспендировали в 300 мкл буфера для FACS. Гейт устанавливали по CD 193-положительным, но CD203c-отрицательным клеткам с высоким значением SSC, которые представляли собой эозинофилы.

Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярная масса, условия реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицируемые во всех возможных случаях термином "приблизительно". Используемые в данном документе термины "приблизительно" и "примерно" означают в пределах 10-15%, предпочтительно в пределах 5-10%. Соответственно, если не указано обратное, числовые параметры, приведенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными значениями, которые могут изменяться в зависимости от желаемых свойств, которых стремятся достичь с помощью настоящего изобретения. По крайней мере и не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов объемом формулы настоящего изобретения, каждый числовой параметр должен быть истолкован, по меньшей мере, с учетом количества приведенных значащих цифр и путем применения обычных методик округления. Несмотря на то что числовые диапазоны и параметры, отражающие широкий объем настоящего изобретения, являются приблизительными значениями, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, приводятся настолько точно, насколько это возможно. Любое числовое значение, однако, по своей сути включает в себе определенные ошибки, неизбежно проистекающие из стандартного отклонения, встречающегося в соответствующих им тестовых измерениях.

Формы существительного единственного числа и аналогичные обозначения, применяемые в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения), должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или если это явно не противоречит контексту. Указание диапазонов значений в данном документе предназначено лишь для того, чтобы служить в качестве сокращенного способа индивидуальной ссылки на каждую отдельную величину, попадающую в диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждая отдельная величина включена в описание так, как если бы она была индивидуально указана в данном документе. Все описанные в данном документе способы можно выполнять в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или это иным образом явно не противоречит контексту. Использование всех возможных примеров или иллюстративной формулировки (например, "такой как"), предложенной в данном документе, предназначено лишь для лучшего освещения настоящего изобретения и не накладывает ограничение на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в описании не должна быть истолкована как указание на любой незаключенный элемент, необходимый для практического осуществления настоящего изобретения.

Группы альтернативных элементов или вариантов осуществления настоящего изобретения, раскры-

того в данном документе, не должны истолковываться как ограничения. Каждый член группы может быть обозначен и заявлен по отдельности или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, встречающимися в данном документе. Предполагается, что один или более членов группы могут быть включены в группу или удалены из нее исходя из соображений удобства и/или патентоспособности. В случаях, когда происходит какое-либо такое включение или удаление, то считается, что описание содержит группу, модифицированную таким образом, которая соответствует письменному описанию всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения описаны в данном документе, в том числе лучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Разумеется, видоизменения этих описанных вариантов осуществления станут очевидными для специалистов в данной области после прочтения приведенного выше описания. Автор настоящего изобретения ожидает, что специалисты в данной области будут использовать такие видоизменения в зависимости от обстоятельств, и авторы настоящего изобретения предусматривают осуществление настоящего изобретения на практике иным образом, нежели конкретно описано в данном документе. Соответственно настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, указанного в формуле изобретения, прилагаемой к данному документу, в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охватывается настоящим изобретением, если иное не указано в данном документе или это иным образом явно не противоречит контексту.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, могут быть дополнительно ограничены в формуле изобретения с помощью формулировки "включающий" или "включающий по сути". При использовании в формуле изобретения переходный термин "включающий", независимо от того, присутствует ли он в поданной заявке или добавлен согласно процедуре внесения изменений, исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в формуле изобретения. Переходный термин "включающий по сути" ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или этапами, а также теми, которые не оказывают существенного влияния на основную(основные) и новую(новые) характеристику(характеристики). Варианты осуществления настоящего изобретения, заявляемые таким образом, в подразумеваемой или в явно выраженной форме описаны в данном документе и включены в него.

Кроме того, во всем настоящем описании были сделаны многочисленные ссылки на патенты и печатные публикации. Каждая из приведенных выше ссылок и печатных публикаций по отдельности включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В заключение, следует понимать, что варианты осуществления настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, иллюстрируют основные идеи настоящего изобретения. Другие модификации, которые можно использовать, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Таким образом, в качестве примера, но без ограничения, альтернативные варианты выполнения настоящего изобретения можно использовать в соответствии с идеями данного документа. Соответственно настоящее изобретение не ограничивается строго тем, что показано и описано.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с помощью первого связывающего домена с Fcε-рецептором I типа (FcεRI) и с помощью второго связывающего домена с Fc-гамма-рецептором IIВ (FcγRIIВ), причем первый связывающий домен содержит константные Cε3- и Cε4-домены IgE, причем второй связывающий домен представляет собой Fab-домен, которое содержит в своем втором связывающем домене в своей вариабельной области тяжелой и легкой цепей следующие последовательности CDR:

(a) SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3) в своей вариабельной области тяжелой цепи и SEQ ID NO: 17 (CDR-L1), SEQ ID NO: 18 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 19 (CDR-L3) в своей вариабельной области легкой цепи или

(b) SEQ ID NO: 20 (CDR-H1), SEQ ID NO: 21 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 22 (CDR-H3) в своей вариабельной области тяжелой цепи и SEQ ID NO: 23 (CDR-L1), SEQ ID NO: 24 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 25 (CDR-L3) в своей вариабельной области легкой цепи.

2. Антитело по п.1, которое является химерным или гуманизированным.

3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 3, по меньшей мере с одной из мутаций, выбранных из группы, включающей замену аминокислоты Q в положении 1 на E, замену аминокислоты V в положении 11 на L, замену аминокислоты G в положении 42 на K, замену аминокислоты S в положении 50 на V, замену аминокислоты Y в положении 53 на S, замену аминокислоты K в положении 58 на T, замену аминокислоты G в положении 61 на A, замену аминокислоты S в положении 75 на T, замену аминокислоты K в положении 76 на R, замену аминокислоты N в положении 77 на S и замену аминокислоты T в положении 78 на N.

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 4, по меньшей мере с одной из мутаций, выбранных из группы, включающей замену аминокислоты Q в положении 1 на N, замену аминокислоты S в положении 28 на N, замену аминокислоты S в положении 31 на T, замену аминокислоты V в положении 33 на L, замену аминокислоты D в положении 34 на A, замену аминокислоты Y в положении 49 на F, замену аминокислоты T в положении 53 на N, замену аминокислоты Y в положении 55 на A, замену аминокислоты L в положении 89 на Q и замену аминокислоты N в положении 93 на Y.

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело повышает уровень фосфорилирования ITIM FcγRIIB в клетках Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где второй связывающий домен имеет в своей переменной области тяжелой цепи аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1 или 3, и/или в своей переменной области легкой цепи аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 4.

7. Антитело по любому из пп.1-6, где первый связывающий домен имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или 36.

8. Антитело по любому из пп.1-7, которое является гликозилированным или дегликозилированным.

9. Антитело по любому из пп.1-8, где антитело связывается *in vitro* с FcγRIIB человека с аффинностью, характеризующейся константой скорости диссоциации, составляющей по меньшей мере  $4,9 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ .

10. Антитело по любому из пп.1-9, где антитело связывается *in vitro* с FcεRI человека с аффинностью, характеризующейся значением Kd по меньшей мере  $1,2 \times 10^{-7} \text{ (M)}$ .

11. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое специфично связывается с эпитопом FcγRIIB человека, содержащим аминокислоты положений 20-40 согласно SEQ ID NO: 5.

12. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп.1-11.

13. Вектор, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновой кислоты по п.12, встроенную в указанный вектор.

14. Клетка-хозяин, трансфицированная последовательностью нуклеиновой кислоты по п.12 или вектором по п.13.

15. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики аллергии на пыльцу, содержащая в качестве активного ингредиента антитело по любому из пп.1-11, нуклеиновую кислоту по п.12, вектор по п.13 или клетку-хозяина по п.14.

16. Применение антитела по любому из пп.1-11 для лечения или профилактики аллергии на пыльцу.

Анализ с помощью SPR вариантов WT и N297A гуманизованного 8A6, GB3 WT и ch8A6 WT

	$k_{off} [\text{c}^{-1}]$
hu8A6_wt	$9,5 \times 10^{-4}$
hu8A6_N297A	$8,8 \times 10^{-4}$
ch8A6_wt	$4,9 \times 10^{-4}$
chGB3_N297A	$1 \times 10^{-2}$

Фиг. 1

### Последовательности hu8A6\_wt и hu8A6-N297A

Аминокислоты переменных областей просто пронумерованы независимо от какой-либо схемы нумерации. Для лучшего понимания замен аминокислот в Fc-домене была выбрана нумерация по EU.

#### Тяжелая цепь/гуманизированное 8A6\_wt (гликозилированное)

VH-домен (вариант VH10)

1 QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS DYYMAWVRQA PGKLEWVAS ISYDGSNKYY  
61 GDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCARPG DYWGQETLVT VSS (SEQ ID NO: 3)

Fc-домен (гликозилированный в N297/аллотип G1m17, содержащий K214; E356; M358; A431/без C-концевого Lys; согласно нумерации по EU)

118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSKV HTPFAVLQSS  
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
238 PSVFLFPPPK KDTLIMSRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYY  
298 STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSREE  
358 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW  
418 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO: 6)

#### Тяжелая цепь/гуманизированное 8A6\_N297A (дегликозилированное)

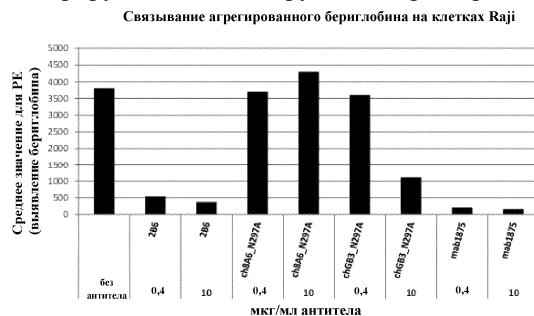
VH-домен см. выше

Fc-домен (вариант N297A/аллотип G1m17, содержащий K214; E356; M358; A431/без C-концевого Lys; согласно нумерации по EU)

118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSKV HTPFAVLQSS  
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
238 PSVFLFPPPK KDTLIMSRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYA  
298 STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSREE  
358 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW  
418 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO: 28)

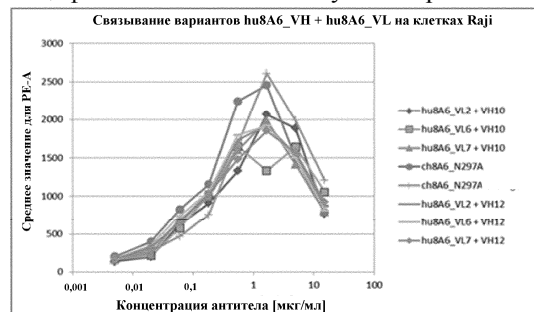
Фиг. 2

### FACS-анализ, демонстрирующий неблокирующие характеристики ch8A6\_N297A



Фиг. 3

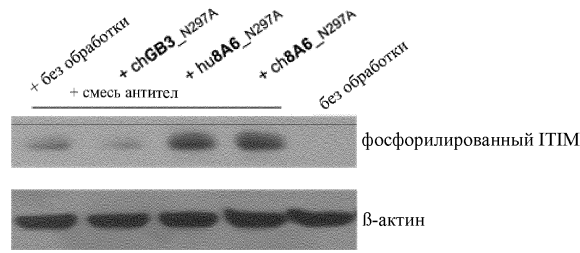
### FACS-анализ специфичности связывания гуманизированных вариантов 8A6



Фиг. 4

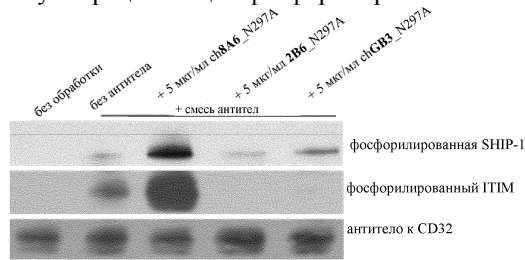


Сравнение эффекта гуманизированного варианта hu8A6\_N297A, а также chGB3\_N297A и ch8A6\_N297A в отношении фосфорилирования ITIM в первичных PBMC



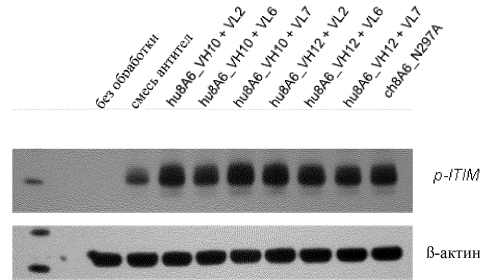
Фиг. 8

Совместная иммунопреципитация фосфорилированной SHIP-1 и FcγRIIB



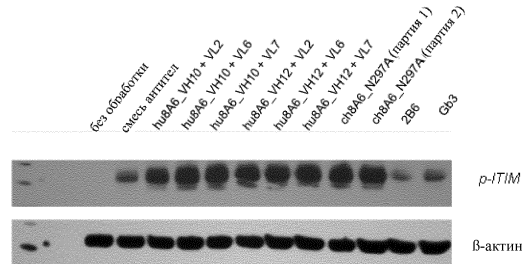
Фиг. 9

Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 с ch8A6\_N297A



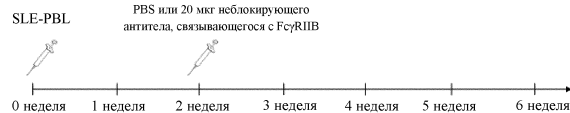
Фиг. 10

Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 с ch8A6\_N297A, 2B6 и chGB3\_N297A



Фиг. 11

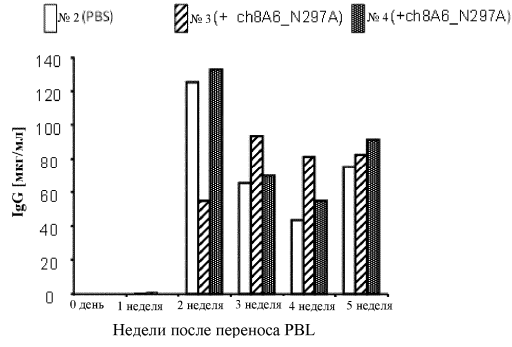
Модель SLE: схема эксперимента



- инъекция мышам  $0,7 \times 10^7$  PBL, выделенных из крови пациента с SLE
- дважды в неделю: инъекция PBS (1 мышь)/20 мкг неблокирующего антитела 8A6, связывающегося с FcγRIIB (2 мыши)
- еженедельное тестирование: в сыворотке крови
  - ELISA в отношении IgM/IgG

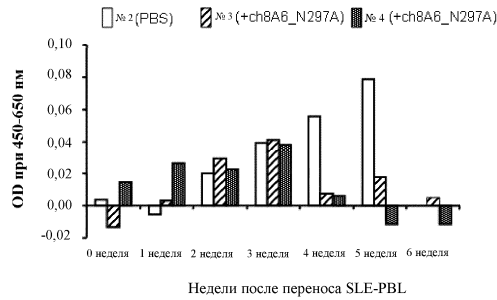
Фиг. 12

Модель SLE PBL, общий сывороточный иммуноглобулин человека

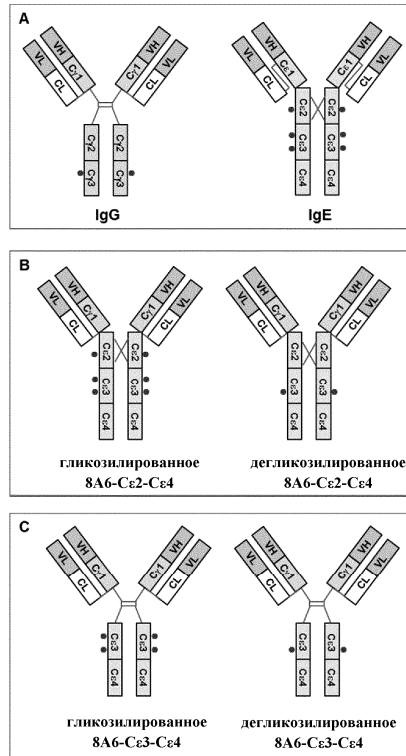


Фиг. 13

Модель SLE PBL, влияние на антитела к ДНК (IgG, специфичные для конкретного заболевания)

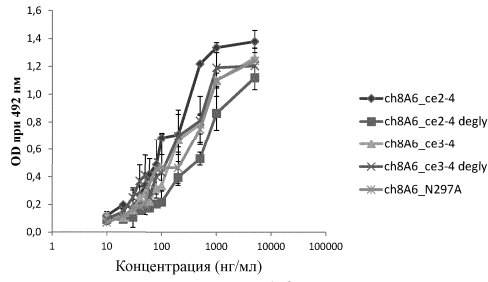


Фиг. 14

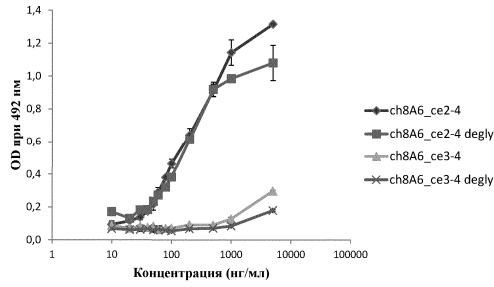


Фиг. 15

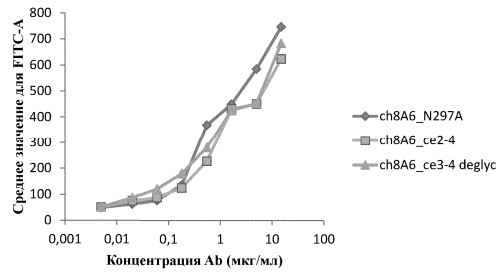




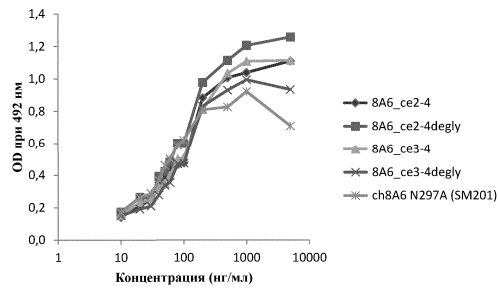
Фиг. 16



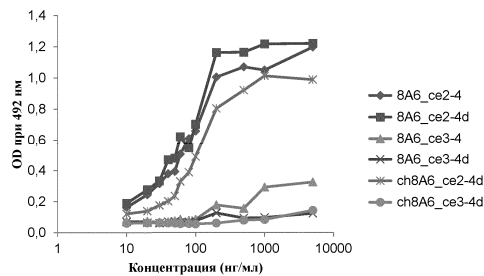
Фиг. 17



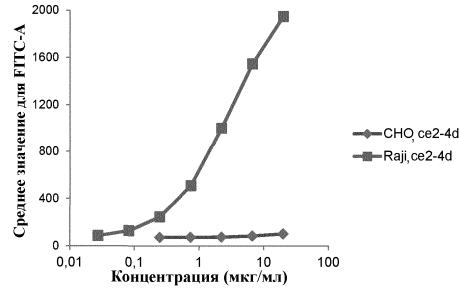
Фиг. 18



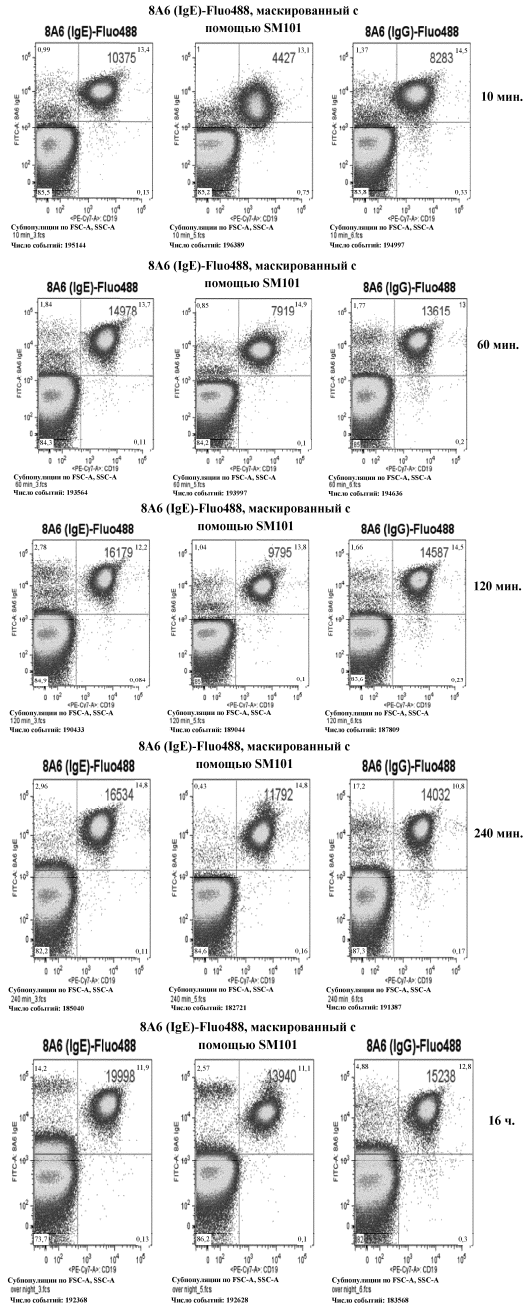
Фиг. 19



Фиг. 20

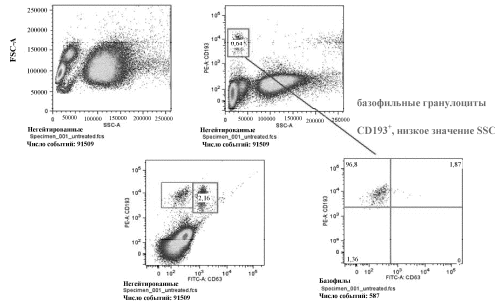


Фиг. 21

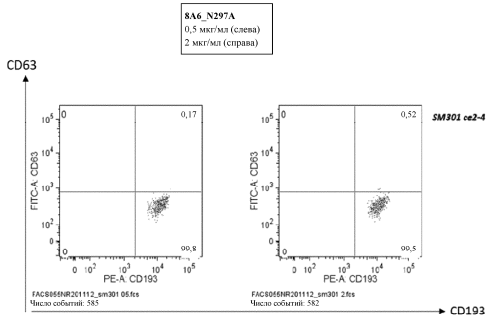
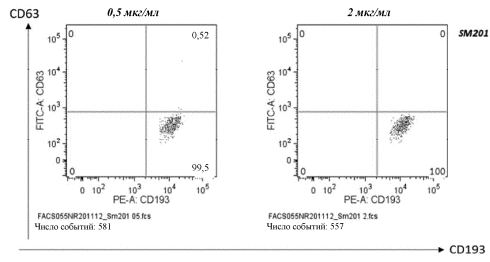


Фиг. 22

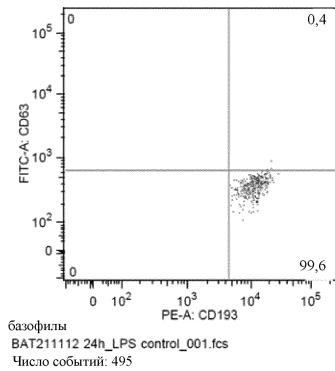
Стратегия гейтирования по CD193 и SSC в FACS



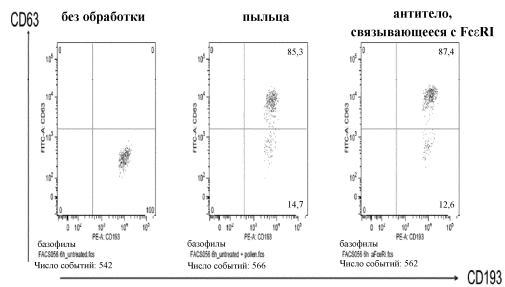
Фиг. 23



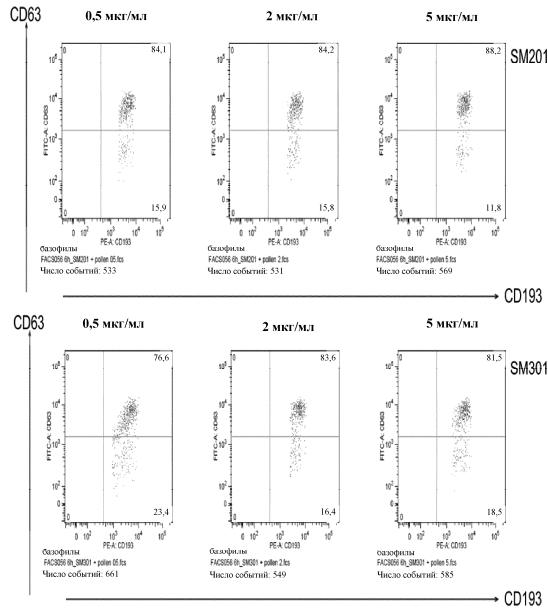
Фиг. 24



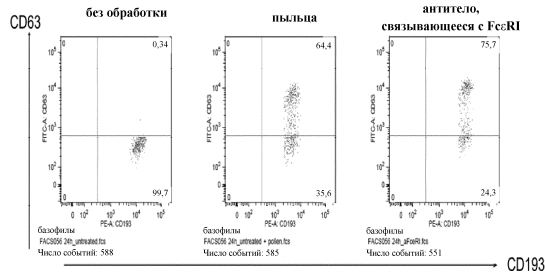
Фиг. 25



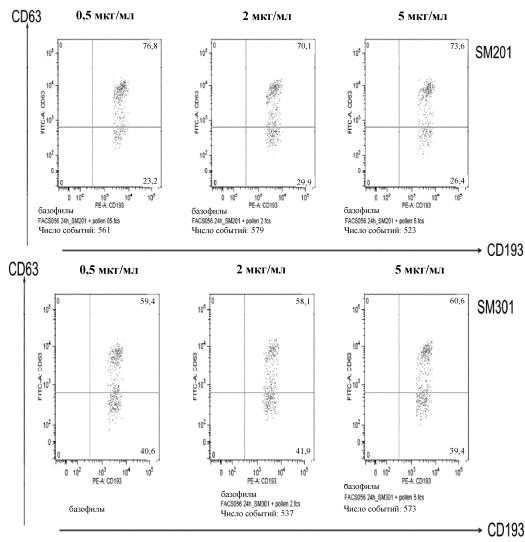
Фиг. 26



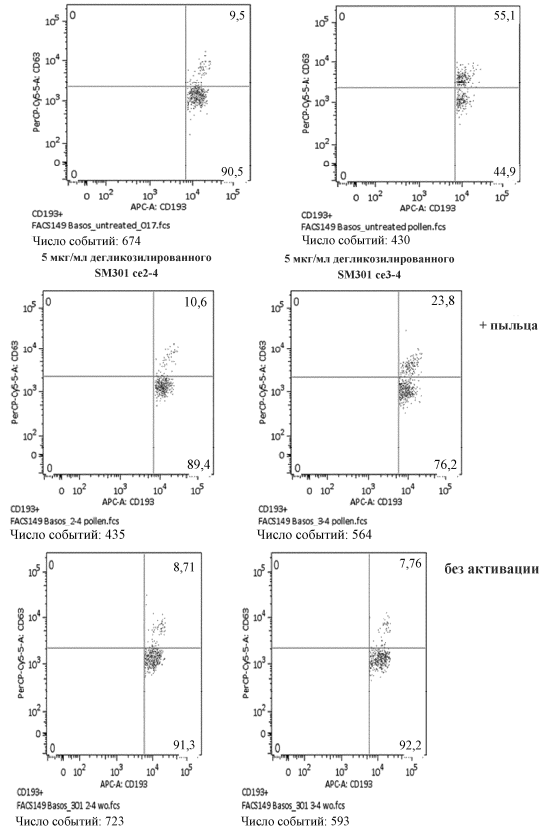
Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30

