

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035855

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.20

(21) Номер заявки
201690383

(22) Дата подачи заявки
2014.08.13

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) НОВЫЕ АНТИТЕЛА К FC-ГАММА-РЕЦЕПТОРУ ПВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 13004094.2

(32) 2013.08.16

(33) EP

(43) 2016.06.30

(86) PCT/EP2014/002234

(87) WO 2015/022077 2015.02.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗУППРЕМОЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Сондерман Петер, Поль Томас, Тер
Мер Доминик, Карле Анна, Эхальт
Даниэла, Рит Николе (DE)

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

(56) WO-A2-2005/051999
WO-A2-2009/083009
WO-A2-2004/016750

(57) В изобретении предусмотрены антитело к FcγRПВ; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая указанное антитело; вектор экспрессии, содержащий по меньшей мере одну указанную последовательность; клетка-хозяин для получения указанного антитела; фармацевтическая композиция для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний; применения указанного антитела для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний; а также способ получения указанного антитела.

035855 B1

035855 B1

035855

B1

Рецепторы FcγRII, члены суперсемейства белков из генов иммуноглобулинов, представляют собой интегральные мембраносвязанные гликопротеины из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 40 кДа, состоящие из двух внеклеточных иммуноглобулиновых доменов, одного трансмембранного домена и цитоплазматического домена переменной длины. Рецепторы FcγRII экспрессируются на ряде гемопоэтических клеток и являются единственными Fc-рецепторами на человеческих тромбоцитах и мегакариocyтах (Cassel, McKenzie, 1993). У людей известны три типа рецепторов FcγRII, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, все из которых связываются с IgG (например, с IgG1 с аффинностью $1-2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$) или иммунными комплексами (IC, например, опсонизированные IgG патогены). FcγRIIA и FcγRIIB отличаются друг от друга главным образом вследствие различий в цитоплазматических доменах, которые в конечном счете приводят к функционально неоднородным ответам на лигирование рецептора. Запуск FcγRIIA приводит к активации клетки (например, фагоцитозу, окислительному взрыву), и FcγRIIB инициирует ингибирующие сигналы, приводящие в результате, например, к ингибированию активации В-клеток. FcγRIIC имеет общий внеклеточный домен с FcγRIIB и цитоплазматический домен с FcγRIIA, таким образом передавая активирующие сигналы после связывания с IgG или IC. FcγRIIB экспрессируется на всех лейкоцитах за исключением Т- и NK-клеток и является единственным ингибирующим Fc-рецептором, экспрессирующимся на человеческих В-клетках. Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, базофилы и тучные клетки совместно экспрессируют активирующий рецептор FcγRIIA и ингибирующий рецептор FcγRIIB, а FcγRIIC экспрессируется на естественных клетках-киллерах (NK-клетках) и составляет единственные FcγR на этом типе клеток. Известны две изоформы для FcγRIIB, которые отличаются своей биологической функцией.

FcγRIIB-1 экспрессируется исключительно на В-клетках, тогда как FcγRIIB-2, который вызывает индукцию эндо-/фагоцитоза после связывания с IC, обнаруживается на всех остальных экспрессирующих FcγRIIB клетках (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

FcγRIIB характеризуется 93% гомологией во внеклеточном участке с FcγRIIA. Как изложено выше, главное различие между FcγRIIA и FcγRIIB находится в цитоплазматическом домене. При том, что FcγRIIA содержит ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив), FcγRIIB содержит ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив). Образование скоплений FcγRIIA посредством связывания с IC приводит к совместной локализации мотива ITAM с рецептор-ассоциированными киназами, осуществляющими фосфорилирование тирозиновых остатков в мотиве ITAM (консенсусная последовательность: Y-X₂-L/I-X₈-Y-X₂-L/I, Isakov, 1997) и последующему взаимодействию с киназой Syk, которая осуществляет активацию клетки посредством многочисленных событий дальнейшей передачи сигнала и активации генов (Ghazizadeh et al., 1994). Связывание иммуноглобулина с активирующим FcγRIIA вызывает провоспалительный ответ, который впоследствии приводит к удалению патогенов, но в случае аутоиммунного антитела также может приводить к разрушению здоровых тканей, достигающему пика при патологическом аутоиммунном заболевании. Таким образом, точный контроль специфичности антитела и система с отрицательной обратной связью необходимы для избежания aberrантного повреждения организма иммунной системой. Ингибирующий FcγRIIB рецептор является частью этой системы с отрицательной обратной связью.

FcγRIIB характеризуется наличием мотива ITIM (консенсусная последовательность: V/I-X-Y-X₂-V/L, Isakov, 1997) в цитоплазматическом домене, который фосфорилируется киназой Lyn после связывания с Ig-агрегатами или IC и совместного лигирования с несущими ITAM активирующими Fcγ-рецепторами. Фосфорилированный ITIM притягивает SH2-домен инозитол-полифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), которая, в свою очередь, гидролизует фосфоинозитольные мессенджеры, высвобождающиеся как следствие опосредованной ITAM-содержащим FcγR активации тирозинкиназы, таким образом предотвращая приток внутриклеточного Ca²⁺. Перекрестное сшивание FcγRIIB ингибирует активирующий ответ на лигирование FcγR, что, в свою очередь, ингибирует активацию, пролиферацию В-клеток и секрецию ими антител.

FcγRIIB характеризуется двумя ингибиторными активностями. Как упоминалось выше, одна из них зависит от мотива ITIM и наблюдается, когда FcγRIIB лигируется с несущим ITAM рецептором (например, FcγRIIA), что приводит в результате к ингибированию запускаемой ITAM мобилизации кальция и клеточной пролиферации. Это означает, что кальций-зависимые процессы, такие как дегрануляция, фагоцитоз, ADCC, высвобождение питокинов и провоспалительная активация, а также пролиферация В-клеток, блокируются FcγRIIB. Вторая ингибирующая активность FcγRIIB включает гомоагрегацию рецептора на В-клетках (образование скоплений FcγRIIB). Гомоагрегация доставляет проапоптотический сигнал в цитоплазму, что может блокироваться при лигировании FcγRIIB с В-клеточным рецептором (BCR). Передача сигнала BCR после связывания с мультивалентным антигеном характеризуется фосфорилированием кластеризованного BCR с помощью Lyn, киназы из семейства Src. Это осуществляемое Lyn фосфорилирование совпадает с ассоциацией BCR с богатыми сфинголипидами и холестерином микродоменами мембраны, которые называются липидными рафтами. Эти нерастворимые липидные рафты играют важную роль в образовании иммунного синапса. Наблюдалось, что взаимодействие BCR с анти-

геном на APC (антигенпрезентирующей клетке) приводит к образованию этого иммунного синапса в зоне взаимодействия находящихся в контакте В-клетки и APC. Совместное лигирование FcγRIIB с BCR дестабилизирует ассоциацию BCR с липидными рафтами, как следствие блокируя образование иммунного синапса В-клеткой. Ингибирование FcγRIIB передачи сигнала с помощью BCR включает фосфорилирование тирозиновых остатков в ITIM цитоплазматического домена рецептора киназой Lyn и последующее привлечение инозитол-фосфатазы SHIP (Daeron et al., 1995, Ravetch and Bolland, 2001).

Научным сообществом принято, что FcγRIIB может рассматриваться как поздняя контрольная точка в ходе развития периферических В-клеток и что он также непосредственно регулирует выживание плазматических клеток. Следовательно, FcγRIIB считается значимой мишенью для лечения нарушений, связанных с В-клетками, и, в особенности, с опосредуемыми В-клетками иммунными ответами. В исследованиях на мышах и людях уже выяснили влияние FcγRIIB на активность В-клеток и толерантность при гуморальном иммунном ответе, где пониженная экспрессия FcγRIIB или ее отсутствие приводили в результате к развитию или обострению проявляющихся аутоиммунных заболеваний. Действительно, FcγRIIB играет ключевую роль в развитии и протекании аутоиммунных заболеваний, таких как первичная иммунная тромбоцитопения, системная красная волчанка, ревматоидный артрит (РА), буллезная пузырчатка, обыкновенная пузырчатка и другие формы пузырчатки, запускаемый В-клетками рассеянный склероз и другие аутоиммунные заболевания, характеризующиеся развитием патогенных иммунных комплексов. В ходе иммунной реакции у здорового индивида патогены, которые попали в кровоток, опсонизируются антителами (иммуноглобулинами, Ig), направленными против эпитопов патогенных организмов, что, в свою очередь, приводит к образованию так называемых иммунных комплексов. Эти иммунные комплексы затем подвергаются фагоцитозу специфическими клетками иммунной системы (например, макрофагами, нейтрофилами, фагоцитами), что приводит к выведению патогенных организмов из кровотока. Также было показано, что FcγRIIB играет решающую роль в периферической толерантности, поскольку у нокаутных по FcγRIIB мышей развивались спонтанные аутоиммунные заболевания. Недостаточности FcγRIIB приводят к чувствительности к индуцируемому аутоиммунному заболеванию (Bolland and ravetch, 2000). У пациентов, страдающих от аутоиммунного заболевания, экспрессия FcγRIIB на В-клетках обычно ослаблена или снижена по сравнению со здоровыми лицами. Принимая во внимание, например, что у наивных В-клеток проявляется нормальная экспрессия FcγRIIB, у В-клеток памяти и бластных формах плазматических клеток от пациентов с РА (ревматоидным артритом) проявляется пониженная экспрессия этого рецептора (Catalan, 2010). Xiang и коллеги также смогли показать, что перекрестное сшивание FcγRIIB на бластных формах плазматических клеток от здоровых доноров посредством присоединенного к поверхности антитела 2.4G2 к FcRIIB приводит к апоптозу (Xiang et. al, 2007).

Исходя из очевидной роли FcγRIIB в аутоиммунных заболеваниях, описанной выше, были разработаны антитела к рецептору с целью обеспечения возможности для лечения или диагностики пациентов. В патентном документе WO 2009/083009 раскрыты антитела к обеим изоформам FcγRIIB, в то время как в патентном документе WO 2004/016750 раскрыты антитела, которые специфично связываются со внеклеточным доменом FcγRIIB, эндогенно экспрессирующегося на человеческой клетке, с аффинностью, по меньшей мере в 10 раз большей, чем та, с которой такие антитела связываются с FcγRIIA, экспрессирующемся на человеческой клетке, принимая во внимание, что внеклеточный домен FcγRIIB и FcγRIIA характеризуется высокой степенью идентичности. В патентном документе EP 1709073 раскрыты антитела, которые являются высокоспецифичными в отношении FcγRIIB, и их применение для диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний, инфекций, опухолей и других аномальных состояний.

Для данной цели весьма желательным является применение антител с высокой специфичностью и аффинностью к рецептору. В частности, высокая специфичность снижает риск перекрестных реакций антитела и вследствие этого отрицательные побочные эффекты, а высокая аффинность повышает действенность и эффективность его применения. Также желательно, чтобы такие антитела являлись неблокирующими, т.е. чтобы их связывание с Fc-рецептором через их варибельный участок не препятствовало связыванию иммунных комплексов (IC) или агрегированного IgG с клетками. Более того, очень желательным выгодным свойством антитела к FcγRIIB является то, что оно воздействует на механизм ингибирующего присоединения FcγRIIB для контроля активации В-клеток. А именно, известно, что внеклеточная часть FcγRIIB содержит так называемый ITIM и что путь передачи сигнала через несущие ITIM рецепторы обычно является ингибирующим в регуляции иммунной системы. Как описано выше, известно, что FcγRIIB имеет ингибирующую регуляторную функцию, когда он связывается Fc частью молекул IgG. Следовательно, желательно использовать ингибирующую регуляторную функцию FcγRIIB с целью контроля В-клеток, которые вовлечены, *inter alia*, в аутоиммунные заболевания.

В итоге, хотя в уровне техники уже раскрыто несколько антител к FcγRIIB с различными специфичностями и аффинностями, все еще существует потребность в улучшенных антителах к FcγRIIB для применения в лечении, профилактике и диагностике аутоиммунных заболеваний у субъекта. Настоящая заявка удовлетворяет данную потребность, обеспечивая антитела, описанные ниже в данном документе,

охарактеризованные в пунктах формулы изобретения и проиллюстрированные прилагаемыми примерами и фигурами.

Неожиданно авторы настоящего изобретения наблюдали, что антитела, обеспечиваемые настоящим изобретением, заметно повышают фосфорилирование ИТМ по сравнению с антителами, раскрытыми в уровне техники, которые также специфично связываются с FcγRIIB, антитела в соответствии с настоящим изобретением неожиданно проявляют гораздо более сильный эффект в отношении фосфорилирования ИТМ, который не мог ожидаться. Такой сильный эффект является преимущественным. В частности, соединение активации-ингибирования, соединение в паре положительного сигнала с ингибирующей петлей, контролирует величину и длительность многих биологических процессов. В В-лимфоцитах распознавание антигена клонотипическим В-клеточным рецептором (BCR) индуцирует сигнал, который может управлять клональным размножением, дифференцировкой, высвобождением цитокинов и, в конечном итоге, продукцией Ig. Неконтролируемая активация предотвращается при угасании активирующего стимула, а также за счет запуска петли отрицательной обратной связи, которая включает взаимодействие с ингибирующим Fcγ-рецептором (FcγR), FcγRIIB (CD32B). Последний механизм запускается, когда BCR распознает антиген в составе иммунного комплекса, что приводит в результате к сопутствующему взаимодействию Fc-домена IgG, связанного с комплексом, с CD32B, тем самым предотвращая размножение клонов В-клетки, которая имеет такую же специфичность, как распознаваемая растворимым IgG. Таким образом, успешная стратегия отрицательной регуляции должна формировать молекулярную основу для петли передачи отрицательного сигнала.

Антитела, предполагаемые настоящим изобретением, проявляют значительно более сильный эффект в отношении фосфорилирования ИТМ в CD32B, и, следовательно, ожидается, что они оказывают более сильное воздействие на петлю передачи отрицательного сигнала, запускаемую фосфорилированием ИТМ в CD32B, что, в свою очередь, контролирует В-клетки, вовлеченные, *inter alia*, в аутоиммунные заболевания.

Конкретно, антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно повышают фосфорилирование ИТМ в FcγRIIB у клеток Daudi по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом. Повышение предпочтительно является 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10-кратным. Исходя из известных из уровня техники антител, которые связываются с CD32B, преимущественные свойства антител согласно настоящему изобретению нельзя было ни ожидать, ни предугадать, не говоря уже о том, что было возможно оправданное ожидание успеха их получения, в частности, CDR или переменных участков тяжелой и/или легкой цепей, охарактеризованных в данном документе. В дополнение к этому улучшенному свойству антител согласно настоящему изобретению антитела, описанные в данном документе, также характеризуются высокой специфичностью в отношении человеческого FcγRIIB и/или являются неблокирующими, т.е. их связывание с Fc-рецептором через их переменный участок(переменные участки) не препятствует связыванию иммунных комплексов (IC) или агрегированных IgG с клетками.

Соответственно настоящее изобретение предусматривает антитело к FcγRIIB, предпочтительно IgG-типа, которое содержит в своем переменном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, которые приведены под SEQ ID NO. 29, 30 и 31, и в своем переменном участке легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 32, 33 и 34. Такое антитело повышает фосфорилирование ИТМ в FcγRIIB клеток Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Из фиг. 7 понятно, что антитела GB3 (см. WO 2005/051999) и 2B6 (см. WO 2004/016750) из уровня техники не способны повышать фосфорилирование ИТМ в FcγRIIB так, как его может повышать антитело согласно настоящему изобретению, такое как 8A6 - либо в виде химерного, либо гуманизированного антитела 8A6. Таким образом, оказывается, что способность или неспособность, соответственно, к повышению фосфорилирования ИТМ в FcγRIIB зависит от CDR, в особенности от некоторых ключевых остатков, которые присутствуют в 8A6, но не присутствуют в GB3 и/или 2B6, соответственно. Следовательно, аминокислоты, которые присутствуют только в CDR 8A6 в положениях, которые отвечают соответствующим положениям в CDR 2B6 или GB3, можно считать "ключевыми остатками".

Визуальное сравнение CDR из 2B6, GB3 и 8A6 в отношении ключевых остатков выявило, что антитело согласно настоящему изобретению содержит в H-CDR1 аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO. 29, в H-CDR2 оно содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO. 30, в H-CDR3 оно содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO. 31, в L-CDR1 оно содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO. 32, в L-CDR2 оно содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO. 33, и в L-CDR3 оно содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO. 34.

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

Соответственно H-CDR1 антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно характери-

зуется идентичностью на 60% или более, как например, на 70, 80 или 90%, с H-CDR1, который приведен под SEQ ID NO. 20.

H-CDR2 антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуется идентичностью на 36% или более, как например, на 40, 50, 60, 70, 80 или 90%, с H-CDR2, который приведен под SEQ ID NO. 21.

H-CDR3 антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуется идентичностью 50% или более, как, например, 60, 70, 80 или 90%, с H-CDR3, который приведен под SEQ ID NO. 22.

L-CDR1 антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуется идентичностью 64% или более, как, например, 70, 80 или 90%, с L-CDR1, который приведен под SEQ ID NO. 23.

L-CDR2 антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуется идентичностью 29% или более, как, например, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%, с L-CDR2, который приведен под SEQ ID NO. 24.

L-CDR3 антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуется идентичностью 78% или более, как, например, 80 или 90%, с L-CDR3, который приведен под SEQ ID NO. 25.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает антитело к FcγRIIB, которое содержит в своем переменном участке 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.

Предпочтительно такое антитело все еще содержит в своих CDR в переменном участке тяжелой и легкой цепей "ключевые остатки", которые определены под SEQ ID NO. 29, 30, 31 (H-CDR) и которые определены под SEQ ID NO. 32, 33 и 34 (L-CDR).

Такое антитело предпочтительно повышает фосфорилирование ITIM в FcγRIIB клеток 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, или эквивалентных методик. Например, в случае выравниваний CDR каждый из CDR (из переменного участка тяжелой и легкой цепей, соответственно), приведенных под SEQ ID NO. 20-25, служит в качестве эталонной последовательности для представляющей интерес последовательности CDR переменного участка тяжелой или легкой цепи, соответственно, например H-CDR1 с 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 (длина в аминокислотах) под 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 значение в процентах, т.е. значение/степень идентичности идентичности в процентах.

Последовательности H-CDR1, приведенные под SEQ ID NO. 14 и 20, являются предпочтительными видами последовательностей из H-CDR1, приведенного под SEQ ID NO. 29.

Последовательности H-CDR2, приведенные под SEQ ID NO. 15 и 21, являются предпочтительными видами последовательностей из H-CDR2, приведенного под SEQ ID NO. 30.

Последовательности H-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 16 и 22, являются предпочтительными видами последовательностей из H-CDR3, приведенного под SEQ ID NO. 31.

Последовательности L-CDR1, приведенные под SEQ ID NO. 17 и 23, являются предпочтительными видами последовательностей из L-CDR1, приведенного под SEQ ID NO. 32.

Последовательности L-CDR2, приведенные под SEQ ID NO. 18 и 24, являются предпочтительными видами последовательностей из L-CDR2, приведенного под SEQ ID NO. 33.

Последовательности L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 19 и 25, являются предпочтительными видами последовательностей из L-CDR3, приведенного под SEQ ID NO. 34.

Соответственно настоящее изобретение предусматривает антитело к FcγRIIB, предпочтительно IgG-типа, которое:

(а) содержит в своем переменном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, которые приведены под SEQ ID NO. 14, 15 и 16, и в своем переменном участке легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и

L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 17, 18 и 19; или

(b) содержит в своем вариабельном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, которые приведены под SEQ ID NO. 20, 21 и 22, и в своем вариабельном участке легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 23, 24 и 25, где указанное антитело предпочтительно повышает фосфорилирование ITIM в FcγRIIB клеток Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

Антитела к FcγRIIB, содержащие в своем вариабельном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, которые приведены под SEQ ID NO. 14, 15 и 16, и в своем вариабельном участке легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 17, 18 и 19, или имеющие в своем вариабельном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, которые приведены под SEQ ID NO. 20, 21 и 22, и в своем вариабельном участке легкой цепи L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, приведенные под SEQ ID NO. 23, 24 и 25, являются предпочтительными антителами. Эти предпочтительные антитела предпочтительно повышают фосфорилирование ITIM в FcγRIIB клеток Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

При использовании в данном документе термин "антитело" означает белок, содержащий один или несколько полипептидов (содержащих один или несколько 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. Известные гены иммуноглобулинов включают гены константных участков каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также бесчисленное множество генов вариабельных участков иммуноглобулинов. В частности, при использовании в данном документе термин "антитело", как правило, означает тетрамерные гликозилированные белки, состоящие из двух легких (L) цепей, каждая массой примерно 25 кДа, и двух тяжелых (H) цепей, каждая массой примерно 50 кДа. В антителах могут присутствовать два типа легкой цепи, называемые лямбда и каппа. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам: A, D, E, G и M, и несколько из них можно дополнительно поделить на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, причем в контексте настоящего изобретения IgG является предпочтительным. Также предусматривается антитело согласно настоящему изобретению, которое имеет константный домен IgE или его часть, с которыми связывается Fc эпсилон рецептор I. Антитело IgM состоит из 5 из основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, тогда как антитела IgA содержат от 2 до 5 из основных единиц из 4 цепей, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в сочетании с J-цепью. В случае IgG единица из 4 цепей обычно имеет массу приблизительно 150000 Да. Каждая легкая цепь включает N-концевой вариабельный (V) домен (VL) и константный (C) домен (CL). Каждая тяжелая цепь включает N-концевой V-домен (VH), три или четыре C-домена (CH) и шарнирный участок.

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 к проявлению ADCC.

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. Предпочтительно фрагмент, такой как Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), и другие фрагменты антитела, 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, а также охватывает моноклональные, моноспецифичные, поли- или мультиспецифичные антитела, такие как биспецифичные антитела, гуманизированные, камелизированные, человеческие, одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутированные, привитые и созданные *in vitro* антитела, причем химерные или гуманизированные антитела являются предпочтительными. Термином "гуманизированное антитело" обычно определяют антитело, в котором кодирующие специфичность CDR в HC и LC были перенесены в соответствующие каркасные части человеческих вариабельных участков ("CDR-прививка"). Термин "антитело" также включает scFv, одноцепочечные антитела, диатела или тетратела, доменные антитела (dAb) и нанотела. В контексте настоящего изобретения термин "антитело" также будет предусматривать би-, три- или мультимерные или би-, три- или мультифункциональные антитела, имеющие несколько антигенсвязывающих сайтов, при этом предпочтительно по меньшей мере один из них является FcγRIIB-специфичным связывающим сайтом.

Более того, используемый в настоящем изобретении 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 аминные группы, но не ограничиваются ими. Фактически ковалентные модификации антител приводят к гликозилированию, пегилированию, ацетилированию, фосфорилированию, амидированию, но не ограничиваются ими.

Антитело согласно настоящему изобретению 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. Предпочтительно выделенное антитело не находится в ассоциации со всеми другими компонентами из среды для его получения. Сопутствующие компоненты среды для получения антитела, как, например, происходящие 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 при использовании секвенатора с вращающимся стаканом, или (2) до однородности при SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием 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 Fc γ RIIB или его фрагментом и не связываются специфично с другими Fc-рецепторами. Антитела или их фрагменты или производные в соответствии с настоящим изобретением связываются с Fc γ RIIB через вариабельный домен антитела. Тем не менее, эти антитела также могут связываться с Fc гамма RIIB через их Fc-домен.

При образовании пары из VH и VL формируется один антигенсвязывающий сайт. CH-домен, наиболее близкий к VH, обозначается как CH1. Каждая L-цепь соединена с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. VH- и VL-домены состоят из четырех участков с относительно консервативными последовательностями, называемых каркасными участками (FR1, FR2, FR3 и FR4), которые образуют остов для трех участков с гипервариабельными последовательностями (определяющие комплементарность участки, CDR). CDR содержат большинство остатков, ответственных за специфичные взаимодействия антитела с антигеном. CDR называются CDR1, CDR2 и CDR3. Соответственно, элементы CDR на тяжелой цепи называются H1 или H-CDR1, H2 или H-CDR2 и H3 или H-CDR3, тогда как элементы CDR на 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. "вариабельный домен(вариабельные домены)"). Вариабельность не распределена равномерно по вариабельным доменам антител; она сконцентрирована в субдоменах каждого из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "определяющими комплементарность участками" (CDR). Термин "CDR", а также форма множественного числа "CDR" относятся к определяющим комплементарность участкам (CDR), из которых три определяют характер связывания вариабельного участка легкой цепи (L1-CDR1, L2-CDR и L3-CDR), и три определяют характер связывания вариабельного участка 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. Вследствие этого CDR могут обозначаться с использованием определений границ по Kabat, Chothia, по остаткам в контактных доменах или по любым другим границам, 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 участки" в вариабельных последовательностях. Определения CDR в соответствии с этими системами, следовательно, могут отличаться по длине и граничным областям с учетом смежного каркасного участка. См., например, Kabat, Chothia и/или MacCallum et al., (Kabat et al., loc. cit; 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.

Предпочтительные вариабельные участки антитела согласно настоящему изобретению приведены под SEQ ID NO. 1, 2, 3 и 4.

Термин "каркасный участок" относится к известным из уровня техники частям вариабельного уча-

стка антитела, которые присутствуют между более дивергентными (т.е. гипервариабельными) CDR. Такие каркасные участки, как правило, называются каркасными частями с 1 по 4 (FR1, FR2, FR3 и FR4) и обеспечивают остов для представления шести CDR (три из тяжелой цепи и три из легкой цепи) в трехмерном пространстве для образования антиген-связывающей поверхности.

Антитела (в том числе их фрагменты и производные) согласно настоящему изобретению предпочтительно или преимущественно повышают фосфорилирование ITIM в FcγRIIB клеток Daudi приблизительно в 4 раза или более, 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 оба антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно 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, 7 и 8, очевидно, что любое из химерного антитела 8A6 (ch8A6) (содержащего крысиные вариабельные участки и человеческий константный участок) или гуманизированного антитела 8A6 (hu8A6) значительно повышает фосфорилирование ITIM по сравнению с антителом GB3 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 фосфорилирования ITIM в FcγRIIB является практически одинаковой (см. фиг. 8), разумно сделать вывод, что CDR являются причиной преимущественного свойства антител согласно настоящему изобретению, заключающегося в значительном повышении фосфорилирования ITIM, например, по сравнению с антителом GB3.

Специалист в данной области техники легко поймет положение для прививки CDR, которые описаны в данном документе для антител согласно настоящему изобретению, в соответствующую каркасную часть или, наоборот, для прививки каркасных участков в антитело, имеющее CDR антитела согласно настоящему изобретению, так, чтобы полученное в результате этого антитело обладало преимущественными свойствами, в частности, свойством повышения фосфорилирования ITIM в CD32B, как описано в данном документе.

Как упоминалось, антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно или преимущественно обладают свойством к повышению фосфорилирования ITIM в FcγRIIB (CD32B) клеток Daudi, например, по сравнению с антителом GB3 из уровня техники, описанным в документе WO 2005/051999, которое характеризуется наличием вариабельного участка тяжелой цепи, приведенной под SEQ ID NO: 7 в заявке WO 2005/051999 (см. SEQ ID NO. 26), и вариабельного участка легкой цепи, приведенной под SEQ ID NO: 5 в заявке WO 2005/051999 (см. SEQ ID NO. 27).

Повышение фосфорилирования ITIM в FcγRIIB (CD32B) клеток Daudi, подвергшихся влиянию антитела, охватываемого настоящим изобретением, предпочтительно составляет 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.

Фосфорилирование ITIM в CD32B (Fc-гамма-рецептор IIB) клеток Daudi предпочтительно определяют следующим образом:

3×10^5 клеток Daudi, суспендированных в среде RPMI 1640, дополненной 1% FBS (фетальная бычья сыворотка), либо оставляют необработанными (контроль), либо инкубируют в течение 25 мин при 37°C, 5% CO₂ со смесью антител, содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышиному IgG (кроличье), где смесь антител содержит 2 мкг/мл α-hIgM (mAB, клон UHB) и 20 мкг/мл α-mIgG. Затем клетки обрабатывают 20 мин при 37°C, 5% CO₂ либо антителом, охватываемым настоящим изобретением, либо антителом, представляющим интерес, которое определено в данном документе ниже, таким как антитело GB3 из заявки WO 2005/051999 соответственно, при этом оба антитела предпочтительно применяют в равной концентрации и необязательно с буфером в качестве контроля (без антитела). Клетки собирают после инкубации при 4°C, лизируют и подвергают анализу с помощью Вестерн-блоттинга, при помощи которого фосфорилирование выявляют с помощью антитела к белку с фосфотирозиновым остатком (антитело к CD32B, содержащему фосфорилированный Y292). При Вестерн-блоттинге необязательно проводят зондирование с использованием антитела, выявляющего, например, 6-актин, который служит в качестве загрузочного контроля для анализа с помощью Вестерн-блоттинга. В качестве альтернативы в отношении клеток Daudi можно применять PBMC (моноклеарные клетки периферической крови) или клетки Raji. Соответственно, во всех вариантах осуществления, в которых применяют клетки Daudi при определении фосфорилирования ITIM, клетки Daudi можно заменить клетками Raji или PBMC.

Антитело к белку с фосфотирозиновым остатком предпочтительно является связанным с группой, генерирующей сигнал. Группа, генерирующая сигнал, относится к композиции, выявляемой с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств. Например, пригодные метки включают радиоактивные метки, такие как ³²P, ³⁵S или ¹²⁵I; флуоресцентные

красители (например, Cy-3, Cy-5); хромофоры, электроноплотные реактивы; ферменты, которые генерируют выявляемый сигнал (например, которые зачастую применяются в ELISA (твердофазный ИФА)); или спиновые метки. Метка или выявляемый фрагмент имеет или генерирует измеримый сигнал, такой как радиоактивный, хромогенный или флуоресцентный сигнал, который можно применять для количественного определения количества связанного выявляемого фрагмента в образце.

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

Повышение фосфорилирования ITIM определяют путем сравнения (i) сигнала, который генерируется группой, генерирующей сигнал, в антителе к белку с фосфотирозиновым остатком, связывающимся с мотивом ITIM в CD32B клеток, которые являлись необработанными ("эталонное значение"), с (ii) сигналом, который генерируется группой, генерирующей сигнал, в антителе к белку с фосфотирозиновым остатком, связывающемся с мотивом ITIM в CD32B клеток, которые обрабатывали антителом, охватываемым настоящим изобретением, при этом, если сигнал (ii) является большим, чем сигнал (i), на повышение фосфорилирования ITIM в CD32B повлияло антитело, охватываемое настоящим изобретением. Для такого сравнения антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют в количестве в диапазоне от 5 до 50 мкг/мл, как например, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл. Например, при сравнении антитела GB3 из уровня техники или любого другого антитела, связывающегося с CD32B (в совокупности называемые "антителом, представляющим интерес"), предпочтительно 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, охватываемым настоящим изобретением, с целью определения способности антитела, представляющего интерес, и антитела, охватываемого настоящим изобретением, в отношении того, во сколько раз каждое антитело может повышать фосфорилирование ITIM в CD32B, фосфорилирование ITIM определяют, как описано выше для антитела, представляющего интерес, и антитела, охватываемого настоящим изобретением. А именно, получают значение для сравнения антитела, представляющего интерес, с необработанными клетками и значение для сравнения антитела, охватываемого настоящим изобретением, с необработанными клетками. Эти значения можно сравнить друг с другом для того, чтобы определить, обладает ли антитело, охватываемое настоящим изобретением, способностью к повышению фосфорилирования ITIM в большей степени, как, например, в 4-10 раз (в том числе 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), чем антитело, представляющее интерес. Для такого сравнения антитело, представляющее интерес, и антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют в количестве в диапазоне от 5 мкг/мл до 50 мкг/мл, как например, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл.

Термин "Fc-гамма-рецептор IIB" используется в данном документе взаимозаменяемо с терминами "FcγRIIB", или "Fcгамма-рецептор IIB", или "Fc-рецептор IIB", или "FcγRIIB" и предусматривает как мембранный FcγRIIB, так и растворимый (т.е. внеклеточную часть Fcγ IIB-рецептора) FcγRIIB. Указанный термин также включает варианты FcγRIIB, такие как FcγRIIB1 и FcγRIIB2, которые отличаются друг от друга вставкой последовательности 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 сайта расщепления сигнальной пептидазой.

Иногда в данном документе FcγRIIB также называют „CD32B". Таким образом, этот термин, а также другие термины, используемые для обозначения Fc-гамма-рецептора IIB, которые описаны выше, можно использовать взаимозаменяемо с термином "CD32B". Fc-гамма-рецептор IIB относится к суперсемейству белков-иммуноглобулинов и обнаруживается на многих линиях гемопоэтических клеток. Как указывает его название, Fc-рецептор IIB распознает Fc- (фрагмент, способный к кристаллизации) часть антител и связывается с ней, т.е. с фрагментом, который соответствует двум C-концевым доменам обеих тяжелых цепей антитела и, как правило, взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками. Предпочтительный FcγRIIB приведен под SEQ ID NO. 5. Предпочтительный растворимый FcγRIIB приведен под SEQ ID NO. 12.

"Растворимый FcγRIIB" также называется "sFcγRIIB".

Используемый в данном документе термин "растворимый Fcγ-рецептор IIB" и аналогичные термины относятся ко внеклеточной части Fcγ-рецептора IIB. Такая часть может быть растворена в жидкости. В целом, растворимые формы любого из 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 трансмембранный участок или внутрицитоплазматический хвост.

Предпочтительно FcγRIIB согласно настоящему изобретению имеет человеческое происхождение или представляет собой человеческий FcγRIIB. Термин "человеческое происхождение" следует истолковывать в самом широком смысле. В целом, оно означает, что FcγR (или его участок или фрагмент) имеет

сходство с человеческим FcγR (т.е. с белком, обнаруживаемым в человеческом организме) или является подобным ему 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 Sonderrmann and Jacob (1999), *Bioll. Chem.* 380(6), 717-721. Вкратце, представляющий интерес ген получают от организма и встраивают в вектор, например, плазмиду или вирус, который далее используют для переноса гена в клетку-хозяина, в которой экспрессируется рекомбинантный ген и продуцируется рекомбинантный белковый продукт. Специалист в данной области без труда установит, какую клетку-хозяина выбрать для того, чтобы получить FcγRIIB, который, например, является подходящим для получения фармацевтической композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть желателен негликозилированный FcγRIIB. Далее специалист в данной области техники может выбрать прокариотическую клетку-хозяина для экспрессии FcγRIIB, лишенную ферментного аппарата, необходимого для гликозилирования белка. В одном варианте осуществления FcγRIIB может экспрессироваться в прокариотах, а затем его можно подвергнуть очистке и рефолдингу в соответствии с описанием заявки WO 00/32767.

В другом варианте осуществления FcγRIIB с высокой степенью очистки можно легко и недорого получать в эукариотических системах экспрессии. Пригодные системы включают эукариотов со специализированным аппаратом для продуцирования внеклеточных белков, например, В-клетки. 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, как указано в данном документе, дополнительно охватывает FcγRIIB, который был модифицирован или изменен в отношении аминокислотной последовательности по сравнению с FcγR дикого типа и включает, например, дополнительные сайты гликозилирования или подобное. Тем не менее, предусматриваются также негликозилированные формы FcγRIIB, и они являются предпочтительным вариантом осуществления FcγRIIB.

Что касается вариабельного участка тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительно, чтобы вариабельный участок тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению содержал 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 предпочтительно характеризуется как содержащее константный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 6, и/или константный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 7.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуется как содержащее константный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 6, и/или константный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 7.

В предпочтительном антителе согласно настоящему изобретению константный участок тяжелой цепи содержит остаток аланина в положении 297 (N297A) в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU, которая описана Edelman et. al. 1969 (соответствует нумерации в последовательности, которая представлена SEQ ID NO.6, показанной на фиг. 2). Антитела с тяжелой цепью, содержащей остаток аланина (Ala, A) в положении 297 (N297A), обозначаются в данном документе индексом "N297A", тогда как антитела, имеющие остаток аспарагина (Asn, N) в указанном положении, представляют собой "дикий тип" и, следовательно, обозначаются в данном документе индексом "(wt)". Как можно увидеть на фиг. 2, вариабельный участок тяжелой цепи гуманизированного антитела 8A6 дикого типа оканчивается аминокислотным остатком "S" в положении 113 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU. Константный участок указанного антитела начинается в положении 118. Получаемый в результате очевидный пробел из 4 аминокислотных остатков вызван переключением на систему нумерации аминокислот в белке EU для константного участка и не означает, что пропущены какие бы то ни было аминокислотные остатки.

Антитела согласно настоящему изобретению, имеющие остаток аланина в положении 297 в аминокислотной последовательности, представленной 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 такого константного участка с N297A приведена под SEQ ID NO. 28. Соответственно антитела согласно настоящему изобретению могут содержать в качестве константного участка аминокислотную по-

следовательность, приведенную под SEQ ID NO. 28. У таких антител отсутствует гликозилирование в положении 297 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU. Таким образом, настоящим изобретением охватываются антитела, у которых отсутствует гликозилирование в положении 297 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU в константном участке тяжелой цепи, а также охватываются антитела, которые гликозилированы в положении 297 в соответствии с нумерацией аминокислот в белке EU в константном участке тяжелой цепи.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения константный домен (Fc-домен) антитела согласно настоящему изобретению имеет аллотип G1m17, содержащий 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 et. al., 2010).

Используемый в данном документе термин "аллотип" относится к человеческому аллотипу антител согласно настоящему изобретению. Аллотипы представляют собой аллельные/генетические варианты в последовательностях константных участков конкретных изотипов. Аллотипы наследуются аллельно. Различные члены вида, таким образом, будут отличаться друг от друга в отношении того, какие конкретные аллели данного изотипа они унаследовали от своих родителей. Km1 и Km2 представляют собой аллотипы человеческих каппа-цепей; G1m(4) и G1m(17) представляют собой аллотипы человеческих гамма-1-цепей.

Что касается вариабельного участка легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительно, чтобы вариабельный участок легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению содержал 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. Такое антитело предпочтительно характеризуется как содержащее константный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 6, и/или константный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 7.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения константный домен легкой цепи относится к аллотипу Km3, содержащему аминокислоты A (Ala) в положении 153 и V (Val) в положении 191.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 1 или 3, и/или вариабельный участок легкой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 2 или 4. Соответственно антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 1, и вариабельный участок легкой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 2, или оно содержит вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 3, и вариабельный участок легкой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 4.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 1, вариабельный участок легкой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 2, константный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 6, и константный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 7.

В качестве альтернативы, антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 3, вариабельный участок легкой цепи, приведенный под SEQ ID NO. 4, константный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 6, и константный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO. 7.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно специфично связывается с эпитопом в пределах аминокислот № 20-40 в человеческом FcγRIIB в соответствии с SEQ ID NO. 5.

Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к части полипептида или белка, которая придает иммуногенную активность у животного и с которой антитело специфично связывается.

Более предпочтительно антитело специфично связывается с эпитопом, содержащим мотив GTN-SPES под SEQ ID NO. 5. Было показано, что этот аминокислотный мотив является очень специфичным эпитопом FcγRIIB. Антитела, которые связываются специфично с этим эпитопом, не связываются с человеческим FcγRIIA. Связывание антитела согласно настоящему изобретению с этим эпитопом через свой(свои) вариабельный участок(вариабельные участки) предпочтительно не препятствует связыванию Fc-частей антител с рецептором и не блокирует нормальное физиологическое функционирование рецептора.

Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению связывается *in vitro* с человеческим FcγRIIB с аффинностью, характеризующейся константой скорости диссоциации, составляющей по

меньшей мере $4,9 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Константу скорости диссоциации (k_{off}) можно измерить с помощью экспериментов с поверхностным плазмонным резонансом. В особенности, 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 вариабельными участками одной тяжелой и одной легкой цепей антитела или его фрагмента или производного и их антигеном (например, FcγRIIB-рецептором) и измеряется *in vitro*. Аффинность определяет силу взаимодействия между эпитопом и антигенсвязывающим сайтом антитела. Аффинность можно рассчитать с использованием следующей формулы:

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

где

KA = константа аффинности,

[AB] = молярная концентрация незанятых сайтов связывания на антителе, [AG] = молярная концентрация незанятых сайтов связывания на антигене, [AB-AG] = молярная концентрация комплекса антитело-антиген.

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

Настоящее изобретение также предусматривает последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют 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, состоящим из ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты могут быть дву- или одностранными и могут содержать одновременно дву- и одностранные фрагменты. Наиболее предпочтительными являются двунитевые молекулы ДНК.

В соответствии с настоящим изобретением последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело согласно настоящему изобретению, содержит нуклеотиды, кодирующие по меньшей мере те части антитела, которые придают свойства специфического связывания антитела согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению кодирует вариабельные участки, предпочтительно, по меньшей мере, CDR, которые описаны в данном документе.

Предпочтительные примеры последовательностей нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению представлены SEQ ID NO. 8-11. Специалист в данной области техники будет осведомлен, что эти нуклеотидные последовательности могут варьировать в зависимости от используемых способов экспрессии и применяемых для этого систем.

Кроме того, настоящим изобретением предусматривается вектор нуклеиновой кислоты, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе, которые кодируют антитело согласно настоящему изобретению. Вектор предпочтительно содержит промотор, под контроль которого помещены вышеуказанные последовательности нуклеиновой кислоты. Вектор может представлять собой прокариотический или эукариотический вектор экспрессии, где рекомбинантная нуклеиновая кислота экспрессируется либо сама, либо в слиянии с другими пептидами или белками.

Настоящим изобретением также предусматривается клетка-хозяин, которая трансфицирована 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 в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящим изобретением также предусматривается способ получения антитела согласно настоящему изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина, которая описана в данном документе, в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в векторе нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, и извлечение полученного таким образом антитела.

Антитело или его фрагмент или производное в соответствии с настоящим изобретением преимущественно можно применять в фармацевтической композиции. Такую фармацевтическую композицию можно применять для лечения или профилактики заболеваний или нарушений, предпочтительно аутоиммунных заболеваний.

FcγRIIB-специфичные антитела согласно настоящему изобретению ингибируют иммунный ответ в В-клетках, дендритных клетках и активированных гранулоцитах (например, макрофагах), что приводит к пониженной продукции иммуностимулирующих медиаторов и к снижению продукции антител, а также представления антигена (например, на дендритных клетках и макрофагах, приводя к снижению рекрутинга Т-клеток). В своей совокупности ингибируется петля обратной связи продукции антитела и по-

вторной стимуляции иммунной системы.

Важно, что связывание антитела к FcγRII согласно настоящему изобретению с рецептором через его вариабельные участки не препятствует связыванию Fc-фрагмента IC или антител с рецептором, и, в отличие от известных блокирующих антител, сохраняется нормальная функция Fc-рецептора.

Таким образом, в еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента антитело или его фрагмент или производное согласно настоящему изобретению. Указанная фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, или вспомогательное вещество, или наполнитель.

Антитела могут обеспечиваться в фармацевтически приемлемых композициях, которые известны из уровня техники или приведены в общепринятых фармакопеях для применения у животных и, более конкретно, у людей.

При необходимости композиция также может содержать незначительные количества увлажняющих или эмульгирующих средств, или средств, придающих буферные свойства с определенным pH. Данные композиции могут быть в форме растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п.

Композиции согласно настоящему изобретению 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 заболевания или нарушения, предпочтительно аутоиммунных заболеваний и наиболее предпочтительно аутоиммунных заболеваний, характеризующихся продукцией аутоиммунных антител.

Значения величины дозы и частоты введения охватываются терминами "терапевтически эффективный" и "профилактически эффективный". Кроме того, доза и частота введения, как правило, будут варьировать 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 заболевания или нарушения, для задержки проявления заболевания, или которое обеспечивает какое-либо терапевтическое преимущество в лечении или ведении заболевания.

Для антител, охватываемых настоящим изобретением, доза, вводимая пациенту, как правило, составляет от 0,0001 до 100 мг/кг массы тела пациента. Предпочтительно вводимая доза составляет приблизительно 15 мг/кг. Хорошо известно, что человеческие антитела характеризуются более длительным временем полужизни в человеческом организме, чем антитела из других видов.

Таким образом, дозу и частоту введения антител согласно настоящему изобретению или их фрагментов или производных можно уменьшить по сравнению с обычно используемыми дозами антител из других видов.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством антител или их фрагментов или производных согласно настоящему изобретению может включать отдельный метод лечения или предпочтительно может включать ряд методов лечения. В предпочтительном варианте осуществления субъекта можно лечить антителами или их фрагментами или производными согласно настоящему изобретению с дозой в диапазоне приблизительно 0,1-30 мг/кг массы тела один раз в неделю в течение периода приблизительно 1-10 недель, предпочтительно 2-8 недель, более предпочтительно приблизительно 3-7 недель. Можно выбрать наиболее выгодную форму и способ применения для обеспечения наибольшей пользы для пациента, подлежащего лечению.

Способы введения антитела или его фрагмента или производного согласно настоящему изобретению включают без ограничения парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное (например, интраназальный и пероральный пути). В конкретном варианте осуществления антитела согласно настоящему изобретению 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, при применении ингалятора или небулайзера, и состав с образующим аэрозоль средством.

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" и "лечение" относятся к введению субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству фармацевтической композиции или антитела, которое является достаточным для лечения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, для задержки проявления заболевания или предоставления какого-либо терапевтического преимущества в лечении или ведении заболевания.

Используемый в данном документе термин "профилактика" относится к применению средства для предупреждения проявления заболевания или нарушения. "Профилактически эффективное количество" определяет количество активного компонента или фармацевтического средства, достаточное для предупреждения 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, характеризующегося повреждением клеток, тканей и/или органов, вызванным иммунной реакцией субъекта на его собственные клетки, ткани и/или органы.

Более того, антитела согласно настоящему изобретению можно применять в целях диагностики для выявления, диагностирования или мониторинга заболеваний или нарушений, в частности аутоиммунных заболеваний. Антитела или их фрагменты или производные согласно настоящему изобретению можно применять для анализа уровней FcγRIIB в биологическом образце с помощью 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 основанные на антителах способы, пригодные для выявления экспрессии генов белков, включают иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунный анализ (RIA).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к диагностической композиции, содержащей антитело согласно настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "диагностический" относится к любому применению антитела согласно настоящему изобретению для диагностики наличия связанного с FcγRIIB аутоиммунного заболевания, например, для определения величины или степени поверхностной экспрессии эндогенного FcγRIIB на клетках индивида или пациента. Он также относится к определению соотношения активирующих FcγRII и ингибирующих FcγRII, например отношения экспрессируемых FcγRIIA и FcγRIIB.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения описанная выше диагностическая композиция предназначена для выявления и диагностики любого заболевания или нарушения, в особенности аутоиммунных заболеваний, характеризующихся продукцией аутоиммунных антител. Иллюстративные аутоиммунные заболевания включают иммунную тромбоцитопению, системную красную волчанку, пернициозную анемию, болезнь Аддисона, диабет I типа, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, дерматомиозит, рассеянный склероз, тяжелую псевдопаралитическую миастению, синдром Рейтера, болезнь Грейвса, обыкновенную и буллезную пузычатку, аутоиммунный гепатит, неспецифический язвенный колит, болезнь холодовых агглютининов, аутоиммунную периферическую невропатию, но не ограничиваются ими.

В предпочтительном варианте осуществления антитела согласно настоящему изобретению применяют для диагностики аутоиммунного заболевания у человека. Например, антитела согласно настоящему изобретению можно применять для определения поверхностной экспрессии FcγRIIB на клетках индивида, страдающего от аутоиммунного заболевания, предпочтительно экспрессию FcγRIIB на В-клетках или плазматических клетках выявляют с использованием антитела в FACS-анализе. Для этого антитело можно модифицировать с помощью маркерного реактива, флуоресцентного маркера или любого другого маркера, о котором специалисту в данной области известно, как о поддающемся обнаружению с использованием стандартных процедур. Антитело согласно настоящему изобретению можно применять в качестве диагностического инструмента в сочетании с антителами, специфичными к человеческому FcγRIIA, известными из уровня техники. Таким образом, можно определять экспрессию FcγRIIB и FcγRIIB на клетках индивида, страдающего от аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания, и можно рассчитать соотношение, которое является маркером болезненного состояния или развития болезни или используется в качестве маркера для диагностики заболевания.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает диагностический набор для выявления аутоиммунных заболеваний, содержащий антитело или его фрагмент или производное согласно настоящему изобретению и необязательно маркерные реактивы, реактивы-носители и/или подходящие и необходимые резервуары.

Последовательности

SEQ ID NO. 1: аминокислотная последовательность варибельного участка тяжелой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 2: аминокислотная последовательность переменного участка легкой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 3: аминокислотная последовательность переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 4: аминокислотная последовательность переменного участка легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 5: аминокислотная последовательность человеческого FcγRIIB.

SEQ ID NO. 6: аминокислотная последовательность константного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6_{wt}.

SEQ ID NO. 7: аминокислотная последовательность константного участка легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6_{wt}.

SEQ ID NO. 8: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 9: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 10: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константный участок тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6_{wt}.

SEQ ID NO. 11: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константный участок легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6_{wt}.

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

SEQ ID NO. 13: аминокислотная последовательность мутированного человеческого растворимого FcγRIIA (sFcγRIIAmut).

SEQ ID NO. 14: аминокислотная последовательность CDR1 переменного участка тяжелой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 15: аминокислотная последовательность CDR2 переменного участка тяжелой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 16: аминокислотная последовательность CDR3 переменного участка тяжелой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 17: аминокислотная последовательность CDR1 переменного участка легкой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 18: аминокислотная последовательность CDR2 переменного участка легкой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 19: аминокислотная последовательность CDR3 переменного участка легкой цепи крысиного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 20: аминокислотная последовательность CDR1 переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 21: аминокислотная последовательность CDR2 переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 22: аминокислотная последовательность CDR3 переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 23: аминокислотная последовательность CDR1 переменного участка легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 24: аминокислотная последовательность CDR2 переменного участка легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

SEQ ID NO. 25: аминокислотная последовательность CDR3 переменного участка легкой цепи гуманизированного антитела hu8A6.

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

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

SEQ ID NO. 28: аминокислотная последовательность константного участка тяжелой цепи, содержащего в положении 297 замену N на A (предполагается, что положение 1 в последовательности, которая приведена в перечне последовательностей, представляет собой положение 118).

SEQ ID NO. 29: аминокислотная последовательность CDR1 переменного участка тяжелой цепи, который содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 30: аминокислотная последовательность CDR2 переменного участка тяжелой цепи, который содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 31: аминокислотная последовательность CDR3 переменного участка тяжелой цепи, который содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 32: аминокислотная последовательность CDR1 переменного участка легкой цепи, ко-

торый содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 33: аминокислотная последовательность CDR2 варибельного участка легкой цепи, который содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

SEQ ID NO. 34: аминокислотная последовательность CDR3 варибельного участка легкой цепи, который содержит ключевые аминокислотные остатки из химерного и гуманизированного антитела 8A6.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса гуманизированного 8A6 в соответствии с SEQ. ID. No. 3 и 4 либо в формате дикого типа, либо в формате N297A, ch8A6_N297A (в соответствии с 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 заданным количеством агрегированного человеческого IgG и варьирующими количествами ch8A6_N297A, chGB3_N297A или блокирующими антителами 2B6 или R&D Ab. Антитела согласно настоящему изобретению являются неблокирующими.

Фиг. 4. Связывание очищенного с использованием белка A антитела (hu8A6_VL + hu8A6_VH и ch8A6_N297A) в концентрации от 15 до 0,005 мкг/мл с нативным FcγRIIB, экспрессируемым на клетках Raji. Гуманизированные варианты 8A6 связываются с высокой авидностью с FcγRIIB, экспрессируемым на клетках Raji.

Фиг. 5. Связывание 15 мкг/мл антитела (hu8A6_VH + hu8A6_VL и ch8A6_N297A) с нативным FcγRIIA, экспрессируемым на клетках K562. Антитела согласно настоящему изобретению не связываются FcγRIIA на K-562.

Фиг. 6a. Фосфорилирование ITIM, повышаемое химерным 8A6 (ch8A6_N297A) в PBMC от здорового донора. PBMC от здорового донора выделяли с использованием разделения с помощью фикола, а затем оставляли необработанными или инкубировали в течение 25 мин со смесью антител, содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышинному IgG (кроличье). После этого клетки обрабатывали 20 мин либо 5 мкг/мл ch8A6_N297A, либо буфером в качестве контроля (без антитела). Клетки собирали после инкубации и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу β-актин = загрузочный контроль.

Фиг. 6b. Контрольный эксперимент по фосфорилированию ITIM. Клетки Daudi оставляли необработанными или обрабатывали в течение 25 мин антителом изотипического контроля, поликлональным антителом к человеческому IgM (поликлон, антитело к hIgM), моноклональным антителом к человеческому IgM (антитело к hIgM), антителом к hIgM + 5 мкг/мл ch8A6_N297A, антителом кролика к мышинному IgG (-мышинный IgG), -мышинным IgG+5 мкг/мл ch8A6_N297A, смесью антитела к hIgM и -мышинного IgG (смесь Ab) или смесью Ab + 5 мкг/мл ch8A6_N297A). β-актин = загрузочный контроль.

Фиг. 6c. Антитела согласно настоящему изобретению усиливают фосфорилирование ITIM в присутствии или в отсутствие перекрестного сшивания/совместного лигирования BCR и Fc-гамма RIIB в первичных PBMC.

Фиг. 7. Сравнение ch8A6_N297A с антителом из уровня техники (chGB3_N297A). Человеческие клетки Daudi инкубировали в течение 25 мин со смесью антител, содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышинному IgG (кроличье), или оставляли необработанными. После этого клетки обрабатывали 20 мин либо изменяющимися количествами chGB3_N297A или ch8A6_N297A, либо буфером в качестве контроля (без антитела). Клетки собирали после инкубации и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу. β-актин = загрузочный контроль.

Фиг. 8. Сравнение эффекта гуманизированного варианта hu8A6_N297A, ch8A6_N297A и chGB3_N297A в отношении фосфорилирования ITIM в первичных PBMC. После перекрестного сшивания BCR и FcγRIIB с помощью смеси антител добавляли различные антитела в концентрации 5 мкг/мл и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга в отношении фосфорилирования ITIM. β-актин = загрузочный контроль.

Фиг. 9. Совместная иммуноосаждение фосфорилированного SHIP-1 с ITIM FcγRIIB. После стимуляции клеток Daudi смесью антител и любым из ch8A6_N297A, блокирующего антитела 2B6 к FcγRIIB или chGB3_N297A (5 мкг/мл) FcγRIIB осаждали из клеточных лизатов и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга в отношении фосфатазы SHIP-1. Антитело к CD32 с использованием панспецифичного антитела к CD32 (AF1330) = загрузочный контроль.

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 инкубироваться в течение 25 мин с буфером (необработанные) или со смесью (смесь антител), содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышинному IgG (кроличье). Затем клетки обрабатывали 20 мин либо 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

инкубации и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу β -актин = загрузочный контроль.

Фиг. 11. Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7) с ch8A6_N297A, блокирующим антителом к Fc γ RIIB и chGB3_N297A. Клетки Daudi оставляли инкубироваться в течение 25 мин с буфером (необработанные) или со смесью (смесь антител), содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышинному IgG (кроличье). Затем клетки обрабатывали 20 мин 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 к Fc γ RIIB или chGB3_N297A. Клетки собирали после инкубации, лизировали в соответствии с протоколом и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга. Лизаты подвергали WB-анализу. β -актин = загрузочный контроль.

Фиг. 12. Схема эксперимента для мышинной модели SLE-PBL. PBL (лейкоциты периферической крови) от пациентов-людей с SLE (системная красная волчанка) переносят в иммунодефицитных мышей. PBL-клетки пересеживают и мышей впоследствии обрабатывают контролем (PBS) или антителом ch8A6_N297A к Fc γ RIIB согласно настоящему изобретению.

Фиг. 13. Общий уровень человеческого IgG [мкг/мл] у мышей, которым пересадили PBL от доноров-людей, страдающих от SLE. Изображены мыши, обработанные контролем (#2, PBS) или ch8A6_N297A (#3 и #4).

Фиг. 14. Снижение уровня специфичных к заболеванию человеческих антител IgG к ДНК у обработанных ch8A6_N297A мышей, начиная с 4 недели после переноса/пересадки SLE-PBL с использованием PBL от доноров-людей, страдающих от SLE. Изображены титры антител IgG к ДНК у двух различных мышей, #3 и #4 (обработанные ch8A6_N297A), #2 демонстрирует контроль с PBS.

Примеры

Получение моноклонального антитела 8A6

Клон 8A6 моноклонального антитела получали путем иммунизации крыс линии Лонг-Эванс рекомбинантным растворимым человеческим Fc γ RIIB-рецептором. Получали клеточные линии гибридом из крысиных клеток селезенки и подвергали скринингу в отношении антител, которые специфично связываются с человеческим Fc γ RIIB с большей аффинностью, чем с Fc γ RIIA. Во-вторых, антитела, продуцируемые вышеупомянутыми гибридомами, подвергали скринингу в отношении неблокирующих характеристик, т.е. эти антитела все еще обеспечивали возможность связывания IgG или IC с мембраносвязанным Fc γ RIIB с использованием методик, известных из уровня техники.

50 мкг очищенного рекомбинантного растворимого человеческого Fc γ RIIB (sFc γ RIIB, SEQ ID NO. 5) вводили внутривенно (i.p.) и подкожно (s.c.) крысам LOU/C с использованием неполного адьюванта Фрейнда, дополненного 5 нмоль CpG 2006 (TIB MOLBIOL, Берлин, Германия). После шестинедельного интервала окончательную бустерную инъекцию 50 мкг sFc γ RIIB и CpG 2006 вводили i.p. и s.c. за три дня до слияния. Слияние линии клеток миеломы с крысиными иммунокомпетентными клетками селезенки осуществляли в соответствии со стандартными процедурами. Супернанаты гибридомы исследовали в твердофазном иммуноанализе с белком sFc γ RIIB или несоответствующим sFc γ RIIA (SEQ ID NO. 12), нанесенным в виде покрытия на планшеты для ELISA. MAb из супернатанта тканевой культуры, связанные с белками, выявляли с использованием конъюгированных с HRP (пероксидаза хрена) mAb к изотипам крысиного IgG (антитело TIB 173 к IgG2a, антитело TIB 174 к IgG2b, антитело TIB 170 к IgG1, все из ATCC (Американская коллекция типовых культур), антитело R-2c к IgG2c, полученное самостоятельно), таким образом избегая mAb класса IgM. MAb 8A6 (крысиное IgG2a) распознавало Fc γ RIIB и не связывалось с Fc γ RIIA на основании антиген-специфичного анализа ELISA. Анализ с использованием FACS использовали для скрининга антител в отношении специфичного связывания нативного антигена). Кроме того, антитела подвергали скринингу в отношении неблокирующих характеристик, т.е. эти антитела все еще обеспечивали возможность связывания IgG или иммунных комплексов мембраносвязанным Fc γ RIIB.

Для получения достаточного количества антитела для характеристики химерных и гуманизированных конструкций клетки CHO-S FreeStyle™ подвергали временной 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 20×10^6 клеток/мл. Для каждой трансфекции 3 мл клеточной суспензии переносили в 6-луночный планшет. Плазмидную ДНК для трансфекции выделяли с использованием набора HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя и элюировали в не содержащей эндотоксин H₂O.

Для каждой трансфекции 75 мкг плазмидной ДНК, кодирующей легкую цепь, и 75 мкг плазмидной ДНК, кодирующей тяжелую цепь, добавляли в клеточную суспензию и осторожно смешивали. После этого добавляли PEI (Polyplus) и осторожно смешивали. Клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C и 5% CO₂ при непрерывном встряхивании (100 об./мин.). В клеточную суспензию доливали среду до конечного объема 15 мл с достижением конечной концентрации клеток 4×10^6 клеток/мл и переносили в

колбу на 125 мл. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ при непрерывном встряхивании (100 об./мин.) и после 6 дней супернатант собирали путем 2-кратного центрифугирования (4000 об./мин, 5 мин). Супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и определяли титр антитела (см. ниже).

Определение титра антитела проводили посредством двух разных способов HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), обращенно-фазовой (RP) HPLC и HPLC с белком А. Анализ RP-HPLC проводили с использованием системы для HPLC серии Agilent 1200. Данные анализировали с использованием программного обеспечения "Chem Station for LC Systems" редакции В.04.02. Компонентами раствора являлись: изопропанол (HPLC Grade; Roth), ацетонитрил (градиентная чистота HPLC; Roth), H₂O (профильтрованная через фильтр с размером пор 0,2 мкм) и тетрафторацетат (TFA) (для синтеза пептидов; Sigma). Растворитель А: H₂O, 0,1% TFA; растворитель В: 60% изопропанола, 30% ацетонитрила, 9,9% H₂O и 0,1% TFA. Использовали колонку Phenomenex Jupiter (#525166-6) с пористостью 300 Å и разделяющий материал с диаметром частиц 5 мкм. Связанное антитело элюировали с линейным градиентом от 30% до 43% растворителя В за 10 мин. Выявление происходило при $\lambda = 210$ нм с использованием детектора для ультрафиолетовой/видимой области спектра.

Анализ HPLC с белком А проводили с использованием системы для HPLC серии Agilent 1200. Данные анализировали с использованием программного обеспечения "Chemstation" в версии редакции В.04.02. Использовали 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 2×20 мм аналитическую предколонку Upchurch помещали 120 мкл перфузионной среды для хроматографии Applied Biosystems Poros® 20A (Life technologies). Связанное антитело элюировали 100% растворителя В. В случае, когда собирали очищенное антитело, фракции нейтрализовали 56 мМ Tris с pH 8,0.

Экспрессируемые антитела очищали с использованием 1 мл колонки с белком А HiTrap™ rProtein A FF column (GE Healthcare) посредством жидкостной экспресс-хроматографии белков (Akta Explorer). Подвижный буфер содержал 10 мМ Tris-HCl с pH 8,0, 150 мМ NaCl, элюирующий буфер состоял из 100 мМ глицина, 150 мМ NaCl, pH 2,7. Элюированные антитела нейтрализовали 60 мМ

Tris-HCl с pH 8,0, концентрировали, стерилизовали фильтрованием и хранили при -80°C.

Скрининг и характеристика антитела 8А6

Скрининг супернатантов гибридом осуществляли с помощью методик, которые известны из уровня техники, например, анализа связывания с использованием ELISA, анализа Biotec или анализа связывания с использованием FACS. Для исследования специфичного связывания антигена химерным 8А6 или гуманизированными вариантами планшеты для ELISA (Nunc-Immuno Plate, F96 Maxisorp) покрывали 1 мкг/мл sFcγRIIB, sFcγRIIA (SEQ ID NO. 12) или sFcγRIIAmut (SEQ ID NO. 13) в PBS (100 мкл/лунку) в течение ночи при 4°C. После 3 этапов отмывки в 0,01% Tween в PBS проводили блокирование 2% BSA в PBS (300 мкл/лунку) в течение 2 ч при комнатной температуре. После 3 этапов отмывки вносили серийные разведения очищенного антитела или супернатанта (100 мкл/лунку) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Очищенные антитела разводили в PBS, 2% BSA. Супернатанты дополняли 10-кратным объемом PBS и 20% BSA с получением конечной концентрации 2% BSA в PBS. В качестве положительного контроля для FcγRIIA использовали козье антитело к FcγRIIA человека (R&D Systems, AF1875). После 3 этапов отмывки в 0,01% Tween в PBS соответствующее вторичное конъюгированное с HRP ослиное антитело к козьему иммуноглобулину (F(ab')₂, Jackson-Immuno-Research) или конъюгированное с HRP козье антитело к иммуноглобулину человека (F(ab')₂, Dianova) инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (100 мкл/лунку). Лунки промывали 6 раз в 0,01% Tween в PBS. Добавляли субстрат (OPD, содержащий 0,03% H₂O₂) (100 мкл/лунку) и реакцию останавливали добавлением 4 М H₂SO₄ (50 мкл/лунку). После этого измеряли оптическое поглощение на спектрометре при длине волны 492 нм.

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

Клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) и отмывали в FACS-буфере (сбалансированный солевой раствор Хенкса, 1% FCS (фетальная телячья сыворотка), 0,01% NaN₃). После дополнительного этапа центрифугирования клетки ресуспендировали в FACS-буфере с получением конечной концентрации клеток 2 × 10⁶ клеток/мл и 50 мкл клеточной суспензии добавляли аликвотами в 96-луночный планшет с U-образным дном. Готовили серийные разведения гуманизированных вариантов и ch8A6 в FACS-буфере.

Для подтверждения экспрессии FcγRIIA на клетках K-562 мышиное антитело к CD32 человека (Stem Cell Technologies Inc., клон VI.3) разводили в FACS-буфере. 50 мкл разведенных антител добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки отмывали 2 раза в FACS-буфере. После этого 50 мкл вторичного конъюгированного с PE козьего антитела к IgG человека (F(ab')₂, Dianova) или вторичного конъюгированного с PE козьего антитела к IgG мыши (F(ab')₂, Dianova) разводили в FACS-буфере, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После 2 этапов отмывки в FACS-буфере клетки ресуспендировали в 300 мкл FACS-буфера и измеряли на приборе BD FACSCanto™ II

(программное обеспечение: BD FACSDiva™).

Для определения того, обеспечивают ли еще антитела к FcγRIIB возможность связывания IgG или иммунных комплексов с мембраносвязанным FcγRIIB, проводили анализ с помощью FACS. Клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин.) и отмывали в FACS-буфере (сбалансированный солевой раствор Хенкса, 1% FCS (фетальная телячья сыворотка), 0,01% NaN₃). После дополнительного этапа центрифугирования клетки ресуспендировали в FACS-буфере с получением конечной концентрации клеток 2×10^6 клеток/мл. Готовили серийные разведения антител (ch8A6_N297A, chGB3_N297A, R&D Ab mab1875) в FACS-буфер. 25 мкл разведенных антител смешивали в 96-луночной планшете с U-образным дном с 25 мкл меченого Alexa488 агрегированного бериглобина (2,5 мкл/лунку). Агрегированный человеческий IgG выделяли с помощью гель-хроматографии на Superdex-200 (16/60) из коммерчески доступного собранного IgG-продукта (бериглобина).

50 мкл клеточной суспензии добавляли к смеси антитело-бериглобин и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клетки отмывали 2 раза в FACS-буфере. После этого 50 мкл вторичного конъюгированного с PE козьего антитела к IgG человека (F(ab')₂, Dianova) или вторичного конъюгированного с PE антитела к крысиному иммуноглобулину разводили в FACS-буфере, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После 2 этапов отмывки в FACS-буфере клетки ресуспендировали в 300 мкл FACS-буфера и измеряли на приборе BD FACSCanto™ II (программное обеспечение: BD FACSDiva™) (фиг. 3).

Анализ связывания с помощью FACS

Анализ специфичного связывания с нативным антигеном химерного 8A6 или гуманизированных вариантов проводили посредством связывания с клетками на клетках Raji и K-562.

Клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин.) и отмывали в FACS-буфере (сбалансированный солевой раствор Хенкса, 1% FCS, 0,01% NaN₃). После дополнительного этапа центрифугирования клетки ресуспендировали в FACS-буфере с получением конечной концентрации клеток 2×10^6 клеток/мл и 50 мкл клеточной суспензии добавляли аликвотами в 96-луночный планшет с U-образным дном. Готовили серийные разведения гуманизированных вариантов и ch8A6 в FACS-буфере.

Клетки Raji и K562 инкубировали с возрастающими концентрациями гуманизированных антител и химерным антителом в качестве контроля. Клетки Raji использовали для исследования связывания на FcγRIIB (фиг. 4), клетки K562 - для анализа неспецифичного связывания с FcγRIIA (фиг. 5). Связанные с клетками антитела выявляли с использованием конъюгированного с PE вторичного антитела. 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 использованием биосенсора Biacore T200 (GE Healthcare / Biacore). Эксперименты проводили в LMU (Мюнхенский университет Людвига-Максимилиана), кафедра биологии и микробиологии, биоаналитическое обслуживающее подразделение. Анализируемые антитела улавливали на сенсорном чипе CM5 серии S с использованием набора для улавливания человеческих антител в соответствии с протоколом производителя. Варианты Hu8A6 или ch8A6 улавливали в концентрации 10 нМ в течение 1 мин. Аналит sFcγRIIB вводили в различных концентрациях в течение 3 мин. Измерения осуществляли при 25°C и непрерывном потоке (10 мкл/мин.). Измерения осуществляли при 25°C и непрерывном потоке (10 мкл/мин.). Данные оценивали с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T200 (версия 1.0), предполагая связывание 1:1.

Химеризация крысиного антитела 8A6

Химерное моноклональное антитело 8A6 к FcγRIIB конструировали путем слияния VH-участка крысиного 8A6 с сигнальным пептидом и константного участка человеческого IgG1. Кроме того, дегликозилированный вариант тяжелой цепи создавали с использованием константного домена IgG1, содержащего мутацию N297A. Для конструирования гена легкой цепи 8A6 VL-участок крысиного 8A6 аналогичным образом сливали с сигнальной последовательностью и последовательностью для константного участка человеческой каппа-цепи. Синтез ДНК для тяжелой и легкой цепи осуществляли с использованием Geneart/Life Technologies с последующим субклонированием в вектор экспрессии у млекопитающих.

Анализы IN VITRO

Клетки, реактивы и антитела

Линии человеческих клеток лимфомы Беркитта Daudi и Ramos приобретали у DSMZ (ACC 78 и ACC 603) и поддерживали в RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen), дополненной 10% FBS (Gibco/Invitrogen), MEM NEAA (Gibco/Invitrogen), 1 mM пируватом натрия (Gibco/Invitrogen) и 2 mM L-глутамином (Gibco/Invitrogen) при 37°C и 5% CO₂. Первичные человеческие В-клетки очищали от гепаринизированной крови здоровых доноров с использованием градиентов плотности фиколла (Leucosep, Greiner Bio-One, Biocoll Separating Solution, Biochrom) и отрицательного выделения с использованием магнитного поля (Dynabeads Untouched Human B Cells, Invitrogen). Чистоту обогащенных В-клеток изучали с помощью FACS-анализа путем окрашивания APC-антителом к hCD19 (BD Pharmingen #555415), PerCP-Cy5.5-антителом к hCD3 (BD Biosciences #332771) и PE-антителом к hCD56 (BD Pharmingen #555515). Первич-

ные В-клетки сразу использовали для экспериментов без дополнительного культивирования. Блокирующее антитело 2B6 к FcγRIIB в соответствии с патентным документом EP 1534335.

Протокол стимуляции с использованием стимулирующей смеси растворимых антител

Для одновременной стимуляции BCR и FcγRIIB создавали систему антител с использованием смеси антител из 2 мкг/мл моноклонального мышинового антитела к hIgM (Southern Biotech #9022-01, клон UHB) и 20 мкг/мл моноклонального кроличьего антитела к mIgG(1,2a,3) (Epitomics #3020-1, клон M111-2), у которых Fc-часть перекрестно реагирует с человеческим FcγRIIB-рецептором. Контрольные эксперименты проводили с 20 мкг/мл поликлонального кроличьего антитела к hIgM (antibodies online #ABIN117299) или смесью, содержащей 2 мкг/мл антитела hIgM и изотипический контроль mIgG2b (клон MPC-11, BD Pharmingen #557351).

3×10^5 клеток из линий клеток лимфомы Daudi или Ramos и первичные В-клетки 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 антител к FcγRIIB 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.

Анализ характера фосфорилирования с помощью Вестерн-блоттинга

Лизис клеток

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

SDS-PAGE

После центрифугирования супернатанты загружали в буфер для образца (буфер для образца NuPAGE LDS, средство для восстановления образца NuPAGE, Invitrogen), вносили в среду для SDS PAGE (гели NuPAGE Novex Bis-Tris Mini, подвижный буфер MES SDS (Invitrogen)). В случае SDS-PAGE добавляли буфер для образца LDS и средство для восстановления и образцы нагревали до 95°C в течение 5 мин. Образцы хранили при -20°C или сразу анализировали с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга.

Перенос белков на PVDF-мембраны и выявление

Впоследствии белки переносили на PVDF-мембраны (Roti-PVDF, Roth, буфер для переноса 10 mM Tris, 100 mM глицин, 10% метанол, условия переноса: постоянный ток 240 mA, 90 мин. при 4°C). Мембраны блокировали 5% BSA в TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) и окрашивали антителом к фосфорилированному FcγRIIB/CD32 (pY292) (Cell Epitomics # 2308-1, 1:50000, при 4°C в течение ночи) или антителом к фосфорилированному белку SHIP (1:1000, Cell Signaling #3941) и конъюгированным с HRP антителом к кроличьему иммуноглобулину (Jackson ImmunoResearch #111-036-045, 1:50000 в TBS-T, 1 час при комнатной температуре). Хемолюминисценцию (проявляемую с помощью WesternLightning Plus, Perkin Elmer) выявляли на рентгеновских пленках.

Стрипирование

Для последующих анализов с использованием антител, направленных в отношении других фосфорилированных белков, 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 мышинному IgG, Sigma-Aldrich # A9044) или антителами к другим участвующим в передаче сигнала белкам.

FcγRIIB-фосфорилирование ITIM в PBMC здорового донора значительно повышается антителами согласно настоящему изобретению

PBMC здорового донора выделяли и либо оставляли необработанными, либо инкубировали в течение 25 минут со стимулирующей смесью (моноклональное мышинное антитело к hIgM и моноклональное кроличье антитело к mIgG). Затем клетки обрабатывали либо ch8A6, либо буфером в качестве контроля. Клеточные лизаты подвергали анализу с помощью Вестерн-блоттинга с использованием соответствующих антител для выявления, которые представлены выше. Было выявлено значительное повышение фосфорилирования мотива ITIM в FcγRIIB клеток (PBMC, В-клетки) (фиг. 6a). Контрольные эксперименты со стимуляцией клеток только стимулирующей смесью или только моноклональным мышинным антителом к hIgM, моноклональным кроличьим антителом к mIgG в сочетании с ch8A6 не показали повышенного фосфорилирования ITIM в FcγRIIB (фиг. 6b). Антитела согласно настоящему изобретению, таким образом, проявляют заметный эффект в отношении фосфорилирования ITIM в человеческих клетках с перекрестно сшитым BCR и мембраносвязанным (эндогенно экспрессируемым) FcγRIIB, а не на непрестимулированных клетках, т.е. клетках без перекрестно сшитого BCR и мембраносвязанного FcγRIIB. В ходе аутоиммунного заболевания BCR и мембраносвязанный FcγRIIB будут перекрестно сшиваться аутоиммунными антигенами или иммунными комплексами (IC). Антитела согласно настоящему изобретению способны к ингибированию патогенных аутореактивных В-клеток при аутоиммунном

заболевании путем повышения фосфорилирования ITIM в FcγRIIB. Тем не менее, антитела согласно настоящему изобретению также способны к повышению фосфорилирования ITIM без перекрестно сшитого BCR (фиг. 6с).

Сравнение эффектов ch8A6 с антителом из уровня техники (chGB3_N297A)

Сравнение эффекта клона ch8A6_N297A и клона chGB3_N297A в отношении фосфорилирования ITIM. Человеческие клетки Daudi обрабатывали смесью антител, а затем ch8A6_N297A, chGB3_N297A или 2B6, как описано выше. Антитело chGB3_N297A, подобно ch8A6_N297A является неблокирующим антителом к FcγRIIB и распознает подобный эпитоп.

Добавление ch8A6_N297A к обработанным смесью антител клеткам показало повышение фосфорилирования ITIM в FcγRIIB уже при концентрациях 0,05 мкг/мл. Хотя повышенные концентрации chGB3_N297A проявляли дозозависимую стимуляцию фосфорилирования ингибирующего мотива, неожиданно данный клон антитела не был способен достигать уровней фосфорилирования, сравнимых с 8A6. Денситометрическое количественное определение на рентгеновской пленке с использованием программного обеспечения "ImageJ" давало при расчете значения максимум 2,8-кратного возрастания числа 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 ясно и неожиданно проявляют повышенное фосфорилирование ITIM в FcγRIIB по сравнению с антителами из уровня техники.

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 человеческих PBMC. После перекрестного сшивания BCR и FcγRIIB с помощью смеси антител добавляли различные антитела в концентрации 5 мкг/мл и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга в отношении фосфорилирования ITIM. И вновь антитела согласно настоящему изобретению неожиданно оказывали значительно повышенный эффект в отношении фосфорилирования ITIM в FcγRIIB по сравнению с антителом из уровня техники (фиг. 8).

Совместное иммуноосаждение фосфорилированного ITIM FcγRIIB с SHIP-1

После перекрестного сшивания рецепторов фосфатаза SHIP привлекается к мембране посредством связывания ее SH2-домена с фосфотирозином в мотиве ITIM в FcγRIIB с последующим фосфорилированием тирозина в мотиве NPXY в C-концевом домене SHIP-1. Релокализация в мембране и последующее фосфорилирование мотива NPXY являются необходимыми для регуляторной функции SHIP-1. Ее эффект в отношении поступления кальция, выживания, роста клеток, блокирования клеточного цикла и апоптоза опосредуется через пути PI3K и Akt. Tyr1021 находится в одном из мотивов NPXY в SHIP-1, и его фосфорилирование является важным для функции SHIP-1 (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

Человеческие клетки Daudi стимулировали смесью антител, которая определена в разделе выше, и после лизиса в буфере для мягкого лизиса (буфер для лизиса CoIP) образцы инкубировали с 2B6 для улавливания FcγRIIB. Комплексы связывали с ферромагнитными гранулами с присоединенным белком G и выделяли на магнитной подставке.

Лизаты с 1×10^7 клеток/образец получали в 500 мкл CoIP буфера для лизиса, инкубируя клетки в течение 30 мин. на льду и перемешивая на вихревой мешалке каждые 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 13000 об./мин в течение 10 мин при 4°C и супернананты переносили в новые пробирки. 500 мкл лизатов инкубировали с 10 мкг 2B6 в течение 2-3 часов при 4°C с переворотом с доннышки на крышку. Магнитные гранулы с присоединенным белком G промывали дважды 500 мкл буфера для лизиса и 50 мкл гранул (1,5 мг) добавляли к комплексам лизат-антитело на ночь при 4°C (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×LDS буфера для образца, содержащего средство для восстановления. После центрифугирования при 4000 × g в течение 30 с 10 мкл супернатанта вносили в среду для SDS-PAGE для анализа с помощью Вестерн-блоттинга.

Анализ лизатов с помощью Вестерн-блоттинга показали значительно возросшие уровни фосфорилированной SHIP-1 в образцах клеток, обработанных смесью антител и ch8A6_N297A. Поскольку осаждение осуществляли со специфичным к FcγRIIB антителом 2B6, совместно осаждалась только выделенная SHIP-1, связанная с FcγRIIB. Мембраны после стрипирования и повторного окрашивания показывали усиленное фосфорилирование ITIM FcγRIIB в образцах, обработанных ch8A6_N297A, что коррелировало с сигналами фосфорилированной SHIP1. Второе повторное окрашивание α-hFcγRIIB a, b, c показало равные количества осажденного рецептора FcγRIIB во всех образцах, служащих в качестве загрузочного контроля для SDS-PAGE (фиг. 9).

Гуманизация ch8A6

ch8A6 гуманизировали путем прививки последовательностей, определяющих комплементарность участков, из крысиного антитела на человеческие каркасные части. Для выбора человеческих каркасных частей последовательности V_H и H_L сравнивали с последовательностями вариабельного и сочленяющего

участка в сегментах гена Ig человека в зародышевой линии, полученными из общедоступных баз данных (IMGT; V-BASE). Последовательности зародышевой линии человека VH_3_30 вместе сIGHJ4 и последовательности зародышевой линии человека VK315 вместе сIGKJ2 выбирали для тяжелой и легкой цепей соответственно.

Создавали несколько вариантов гуманизированных тяжелой и легкой цепей. Гены, кодирующие сконструированные последовательности гуманизированных V_H и V_L , синтезировали с использованием Life Science Technologies / Geneart с последующим субклонированием в вектор экспрессии у млекопитающих. Процедуру скрининга вариантов антитела осуществляли сразу на супернатанте от трансфицированных клеток CHO-S (Invitrogen). Химерное антитело 8A6 служило в качестве контроля и стандарта для трансфекции в ходе скрининга гуманизированных вариантов. Варианты Hu8A6 анализировали в отношении связывания на sFcγRIIB и sFcγRIIA посредством ELISA и на нативном FcγRIIB посредством FACS на клетках Raji (см. выше). Кроме того, определение кинетических характеристик вариантов антитела осуществляли с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

Исследование гуманизированных вариантов 8A6

Для исследования активностей в отношении фосфорилирования у гуманизированных вариантов 8A6 клетки Daudi стимулировали смесью антител, обрабатывали 0,5 или 5 мкг/мл различных вариантов 8A6 и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга в отношении фосфорилирования ITIM.

Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 с ch8A6_N297A

Все исследуемые гуманизированные 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 аффинности в отношении различных комбинаций тяжелой и легкой цепи, эти различия не выявлялись анализами с помощью Вестерн-блоттинга (фиг. 10).

Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 с ch8A6_N297A, блокирующим антителом к FcγRIIB (2B6) и chGB3_N297A

После выбора окончательной комбинации гуманизированных цепей этот вариант, сочетающий тяжелую цепь V_H10 с легкой цепью V_L6 , наконец сравнивали с антителами ch8A6_N297A, 2B6 и chGB3_N297A (фиг. 11).

Анализы IN VIVO

Модель SLE-PBL

Rag2/гамма-с/Fcγ/- мышей облучали в дозе 6 Гр и им вводили внутрибрюшинно варьированные количества лейкоцитов периферической крови человека в 500 мкл PBS.

Обработку мышей начинали через 2 недели после инъекции клеток после того, как пересадку PBL от пациентов-людей со SLE мышам подтверждали наличием человеческого иммуноглобулина M или G. Мышей обрабатывали путем введения 200 мкл буфера (PBS) или 20 мкг антитела (ch8A6_N297A) в 200 мкл PBS внутрибрюшинно дважды в неделю в течение 4 недель. Мышей взвешивали и брали кровь для получения сыворотки один раз в неделю. Образцы сыворотки замораживали при -80°C до дальнейшего использования (фиг. 12).

ELISA

Образцы сыворотки анализировали с помощью ELISA в отношении присутствия общего количества человеческого IgG, IgM и антител IgM и IgG к ДНК.

Для количественного определения общего количества сывороточных IgM и IgG в образцах сыворотки использовали набор для количественного определения человеческого IgM с помощью ELISA Bethyl и набор для количественного определения человеческого IgG с помощью ELISA (Biomol) в соответствии с инструкциями производителя. OD (оптическая плотность) измеряли с использованием настраиваемого микропланшет-ридера VersaMax (Molecular Devices) при длине волны 450 и 650 нм.

Для выявления антител к ДНК планшеты для ELISA покрывали метилированным BSA (Sigma) в PBS при концентрации 10 мкг/мл в течение 2 ч при комнатной температуре. После отмывки планшеты покрывали ДНК тимуса теленка (Sigma) при концентрации 50 мкг/мл в PBS при 4°C в течение ночи. Блокирование не специфического связывания осуществляли с использованием смеси PBS/0,1% желатин/3% BSA/1 mM EDTA в течение 2 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки разводили 1:100 в блокирующем растворе и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве выявляющего антитела использовали конъюгированное с HRP антитело из набора для количественного определения человеческого IgM (Bethyl) и его разводили 1:10000 в блокирующем растворе с последующей инкубацией в течение 1 часа при комнатной температуре. PBS использовали для всех этапов отмывки. Для выявления добавляли раствор TMB (тетраметилбензидин) и реакцию останавливали 6% ортофосфорной кислотой.

Модель SLE-PBL, общее количество сывороточного иммуноглобулина человека

Анализировали общие уровни человеческого IgG [мкг/мл] у мышей, которым пересадили PBL от доноров-людей, страдающих от SLE. Не выявили существенного отличия в общем количестве человеческого IgG между PBS или антителом к FcγRIIB. Антитело согласно настоящему изобретению не оказы-

вало существенного влияния на общее количество человеческого IgG (фиг. 13).

Модель SLE-PBL, влияние на антитела к ДНК (специфичный к заболеванию IgG)

Значительное снижение количества специфичного к заболеванию человеческого IgG антитела к ДНК у мышей с антителом к FcγRIIB наблюдали, начиная с 4 недели после переноса/пересадки SLE-PBL.

Антитела согласно настоящему изобретению специфично снижают количество связанных с заболеванием антител к ДНК (фиг. 14).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

Almagro J.C. and Fransson J. (2008), Humanization of antibodies. *Front Biosci* 13:1619-33.

Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., Fridman, W.H. (1992), Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes, *Science* 256, 1808-1812.

Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. 2010. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 345-352.

Bolland S, Ravetch JV (2000), Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13(2), 277-85.

Cassel DL, Keller MA, Surrey S, Schwartz E, Schreiber AD, Rappaport EF, McKenzie SE Differential expression of Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIB and Fc gamma RIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol.* 1993 Apr; 30(5):451-60.

Chan AC and Carter PJ. 2010. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation *Nat. Rev., Immunol.* 10(5):301-16.

Daeron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman WH. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcγR-dependent cell activation. *Immunity* 3:635–46.

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 63(1):78-85.

Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. & Fleit, H.B. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with FcγRII and monocytic THP-1 cells, *J.Biol. Chem.* 269, 8878-8884 (1994)

Hammerling et al. Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)

Harlow et al. (2nd Ed. 1988), Antibodies: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Isakov N. (1997), ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res.* 16, 85-100.

Jones, P.T. et al. (1968), Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* 321:522-525.

Malmborg AC, Borrebaeck CA. (1995) BIAcore as a tool in antibody engineering. *J Immunol Methods.* 1995 Jun 14;183(1):7-13.

Nimmerjahn F, Ravetch JV 2008. Fc receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8, 34-47.

Presta L.G. (2008), Molecular engineering and design of therapeutic antibodies.

Curr Opin Immunol. 20(4):460-70.

Ravetch, J. V. and Bolland, S. (2001), IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.

Reichert JM. (2012) Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 4(3):413-5

Santos A.D. and Padlan E.A. (1998), Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 60:169-94.

Winter G, Milstein C. (1991) Man-made antibodies. *Nature.* 349(6307):293-9.

Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KG. 2007. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol.* 8(4):419-29.

Zhou, M.-J., Todd, R.F., van de Winkel, J.G.J., Petty, H.R. (1993), Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with FcγRIII on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions, *J. Immunol.* 150, 3030-3041.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к FcγRIIB, которое содержит:

а) в варибельном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 с последовательностями SEQ ID NO. 14, 15 и 16, а в варибельном участке легкой цепи - L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 с последовательностями SEQ ID NO. 17, 18 и 19 или

(b) в варибельном участке тяжелой цепи H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 с последовательностями SEQ ID NO. 20, 21 и 22, а в варибельном участке легкой цепи - L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 с последовательностями SEQ ID NO. 23, 24 и 25,

где указанное антитело повышает фосфорилирование ITIM FcγRIIB клеток Daudi приблизительно в 4-10 раз по сравнению с клетками Daudi, не обработанными указанным антителом.

2. Антитело по п.1, которое является химерным или гуманизированным.
3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность 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 вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность 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, которое содержит вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO. 1 или 3.
6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое содержит вариабельный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO. 2 или 4.
7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое специфично связывается с аминокислотами №№ 20-40 в человеческом FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO. 5.
8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается *in vitro* с человеческим FcγRIIB с аффинностью, характеризующейся константой скорости диссоциации, составляющей по меньшей мере $4,9 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$.
9. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое содержит в своем константном участке тяжелой цепи аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 6.
10. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое содержит в своем константном участке легкой цепи аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 7.
11. Антитело к FcγRIIB, которое содержит:
 - а) вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO. 1 и вариабельный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO. 2 или
 - б) вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO. 3 и вариабельный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO. 4.
12. Антитело по п.11, которое содержит в константном участке тяжелой цепи аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 6.
13. Антитело по п.11 или 12, которое содержит в константном участке легкой цепи аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 7.
14. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп.1-13.
15. Вектор экспрессии, содержащий по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты по п.14.
16. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп.1-13, трансфицированная вектором экспрессии по п.15.
17. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний, содержащая в качестве активного ингредиента антитело по любому из пп.1-13.
18. Применение антитела по любому из пп.1-13 в способе лечения или профилактики аутоиммунного заболевания, причем указанное аутоиммунное заболевание характеризуется продукцией аутоиммунных антител.
19. Применение антитела по любому из пп.1-13 в способе лечения или профилактики иммунной тромбоцитопении, системной красной волчанки, пернициозной анемии, болезни Аддисона, диабета 1 типа, ревматоидного артрита, синдрома Шегрена, дерматомиозита, рассеянного склероза, тяжелой псевдопаралитической миастении, синдрома Рейтера, болезни Грейвса, обыкновенной и буллезной пузырчатки, аутоиммунного гепатита, неспецифического язвенного колита, болезни холодовых агглютининов и аутоиммунной периферической невропатии.
20. Способ получения антитела по любому из пп.1-13, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в векторе по п.15, и выделение полученного таким образом антитела.

SPR-анализ гуманизированных вариантов 8A6 WT и N297A, GB3 WT и ch8A6 WT

	K_{off} [s^{-1}]
hu8A6_wt	9.5×10^{-4}
hu8A6_N297A	8.8×10^{-4}
ch8A6_wt	4.9×10^{-4}
chGB3_N297A	1×10^{-2}

Фиг. 1. Анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса гуманизированного 8A6 (hu8A6_VH10+VL6) в соответствии с SEQ. ID. No. 3 и 4 либо в формате дикого типа, либо в формате N297, ch8A6_WT (в соответствии с SEQ. ID. NO. 1 и 2) и chGB3_N297A.

Последовательность hu8A6_wt и hu8A6-N297A

- 5 Аминокислоты в варибельных участках пронумерованы вне зависимости от схемы нумерации. Для лучшего понимания изменений аминокислот в Fc-домене была выбрана EU-нумерация.

Тяжелая цепь / гуманизированное 8A6_wt (гликозилированное)

- 10 VH-домен (вариант VH10)

1 QVQLVESGGG VVQPGRSRL SCAASGFTFS DYMAWVRQA PGKLEWVAS ISYDGSNKYY
61 GDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARPG DYWGQGLVT VSS (SEQ ID NO. 3)

- 15 Fc-домен (гликозилированный N297 / аллотип G1m17, содержащий K214; E356; M358; A431 / без C-концевого Lys; в соответствии с Eu-нумерацией)

118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVTS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG
238 PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
20 298 STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
358 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
418 QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO. 6)

Тяжелая цепь / гуманизированное 8A6_N297A (дегликозилированное)

- 25 VH-домен см. выше

Fc-домен (вариант с N297A / аллотип G1m17, содержащий K214; E356; M358; A431 / без C-концевого Lys; в соответствии с Eu-нумерацией)

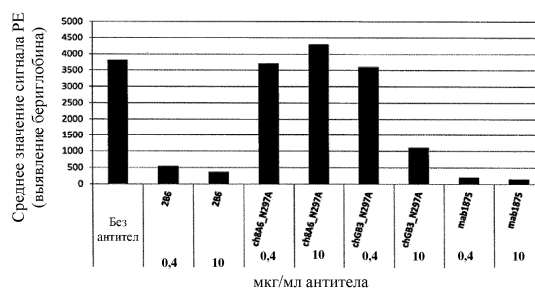
- 118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVTS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG
30 238 PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYA
298 STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
358 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
418 QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO. 28)

35

Фиг. 2. Последовательности вариантов hu8A6_wt и hu8A6_N297A, показывающие положение аминокислотной модификации N на A в формате N297A

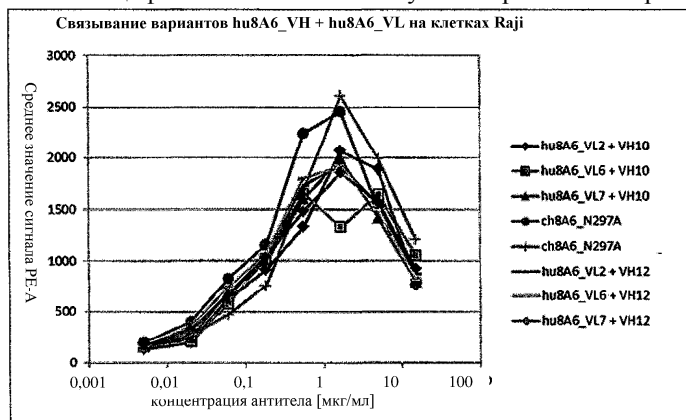
FACS-анализ, показывающий характеристики неблокирующих свойств ch8A6_N297A

Связывание агрегированного бергилобина на клетках Raji



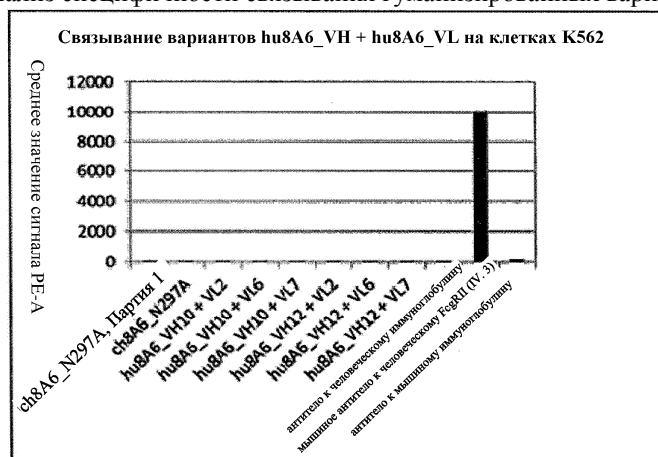
Фиг. 3. Характеристика неблокирующих свойств ch8A6_N297A. Клетки Raji инкубировали с заданным количеством агрегированного человеческого IgG и варьирующими количествами ch8A6_N297A, chGB3_N297A или блокирующих антител 2B6 или mab1875 (R&D). Антитела согласно настоящему изобретению являются неблокирующими

FACS-анализ специфичности связывания гуманизированных вариантов 8A6



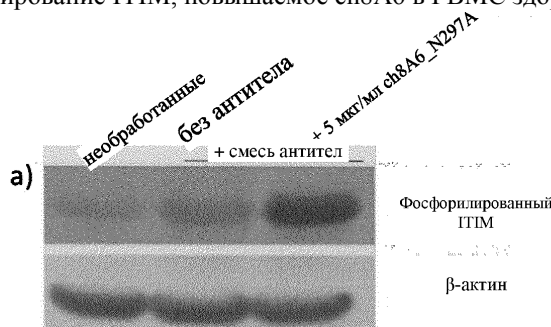
Фиг. 4. Связывание очищенного с использованием белка A антитела (hu8A6_VL + hu8A6_VH и ch8A6_N297A) в концентрации от 15 до 0,005 мкг/мл с нативным FcγRIIB, экспрессируемым на клетках Raji. Гуманизированные варианты 8A6 связываются с высокой авидностью с FcγRIIB, экспрессируемым на клетках Raji.

FACS-анализ специфичности связывания гуманизированных вариантов 8A6



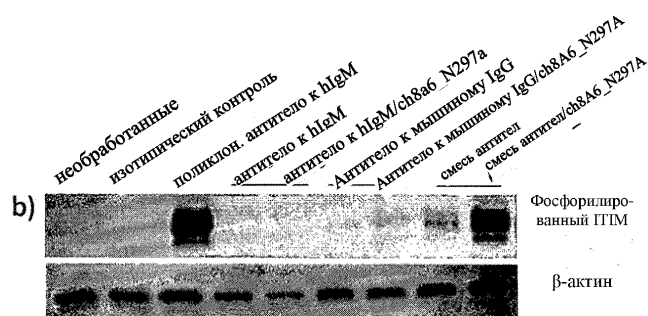
Фиг. 5. Связывание очищенного с использованием белка A (hu8A6_VH + hu8A6_VL и ch8A6_N297A) и ch8A6_N297A в концентрации 15 мкг/мл с нативным FcγRIIA, экспрессируемым на клетках K562. Антитела согласно настоящему изобретению не связываются с FcγRIIA на K-562.

Фосфорилирование ITIM, повышаемое ch8A6 в PBMC здорового донора



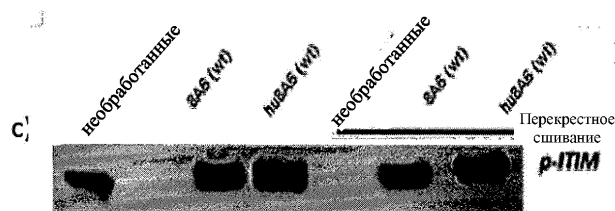
Фиг. 6а. Анализ фосфорилирования ITIM

PBMC от здорового донора выделяли с помощью разделения с использованием фиколла, а затем оставляли необработанными или инкубировали в течение 25 мин со смесью антител, содержащей антитело к IgM (мышиное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышиному IgG (кроличье). После этого клетки обрабатывали 20 мин либо 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. β-актин = загрузочный контроль.



Фиг. 6b. Контрольный эксперимент по фосфорилированию ITIM

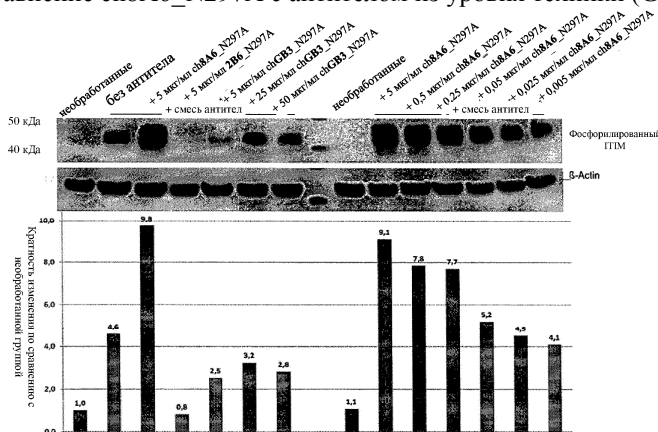
Клетки Daudi оставляли необработанными или обрабатывали в течение 25 мин антителом изотипического контроля, поликлональным антителом к человеческому IgM (поликлон, антитело к hIgM), моноклональным антителом к человеческому IgM (антитело к hIgM), антителом к hIgM + 5 мкг/мл ch8A6_N297A, антителом кролика к мышиному IgG (антитело к мышиному IgG), антителом к мышиному IgG+5 мкг/мл ch8A6_N297A, смесью антитела к hIgM и антитела к мышиному IgG (смесь Ab) или смесью Ab + 5 мкг/мл ch8A6_N297A). β-актин = загрузочный контроль.



Фиг. 6с

8A6 (wt), а также hu8A6 показывали сильное фосфорилирование Fc-гамма-RIIB без необходимости предшествующего совместного лигирования BCR и FcγRIIB. После перекрестного сшивания рецепторов смесью антител 8A6 (wt) и hu8A6, как и ожидалось, были способны к индукции фосфорилирования ITIM.

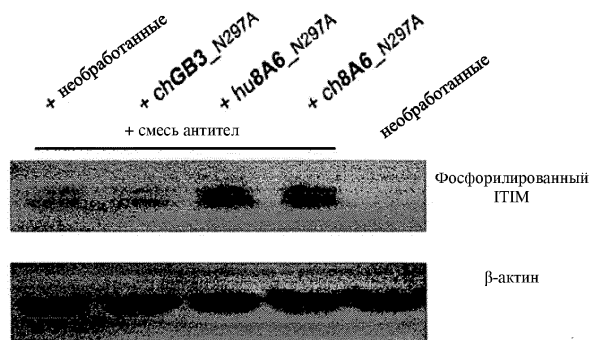
Сравнение ch8A6_N297A с антителом из уровня техники (GB3)



Фиг. 7. Анализ фосфорилирования ITIM

Клетки Daudi либо оставляли необработанными, либо инкубировали в течение 25 мин со смесью антител, содержащей антитело к IgM (мышиное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышиному IgG (кроличье). После этого клетки обрабатывали 20 мин либо варьирующими 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 = загрузочный контроль.

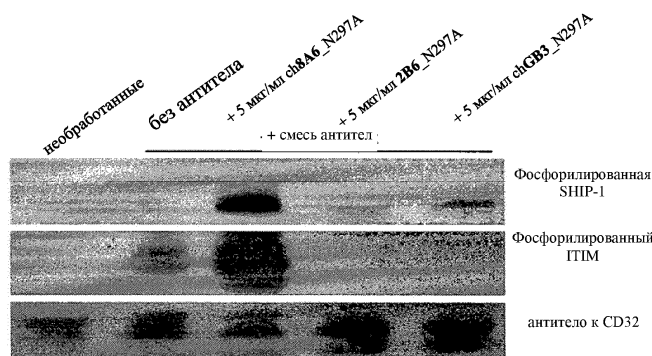
Сравнение эффекта гуманизированного варианта hu8A6_N297A, chGB3_N297A и ch8A6_N297A в отношении фосфорилирования ITIM в первичных PBMC



Фиг. 8. Сравнение эффекта гуманизированного варианта hu8A6_N297A, chGB3_N297A и ch8A6_N297A в отношении фосфорилирования ITIM в первичных PBMC

После перекрестного сшивания BCR и FcγRIIB смесью антител различные антитела добавляли в концентрации 5 мкг/мл и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга в отношении фосфорилирования ITIM. β-актин = загрузочный контроль.

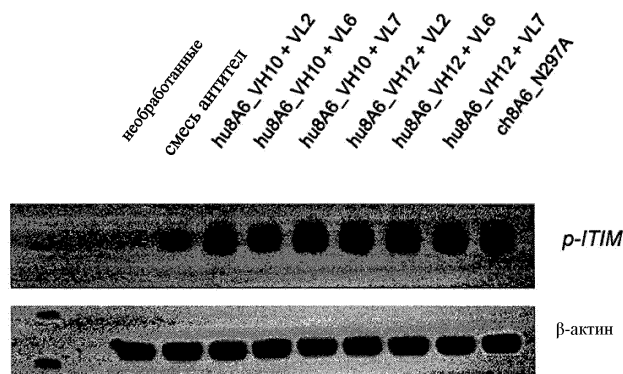
Совместное иммуноосаждение фосфорилированного SHIP-1 с FcγRIIB



Фиг. 9. Совместное иммуноосаждение фосфорилированного SHIP-1 и FcγRIIB с ITIM

После стимуляции клеток Daudi смесью антител и любым из ch8A6_N297A, блокирующего антитела 2B6 к FcγRIIB или chGB3_N297A (5 мкг/мл) FcγRIIB осаждали из клеточных лизатов и проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга в отношении фосфатазы SHIP-1. Антитело к CD32 с использованием панспецифичного антитела к CD32 (AF1330) = загрузочный контроль.

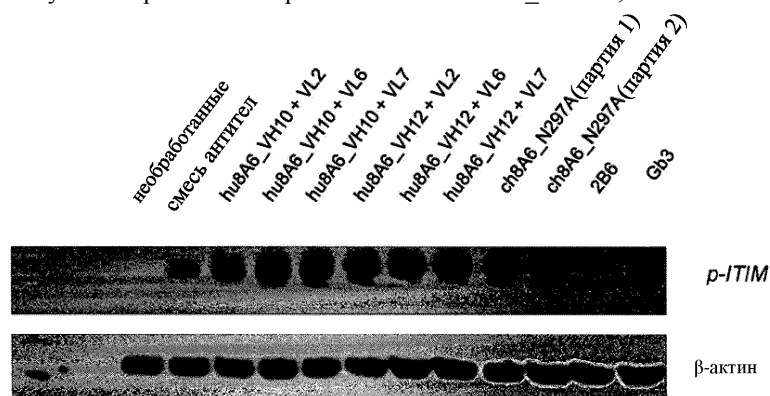
Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 с ch8A6_N297A



Фиг. 10. Анализ фосфорилирования ITIM

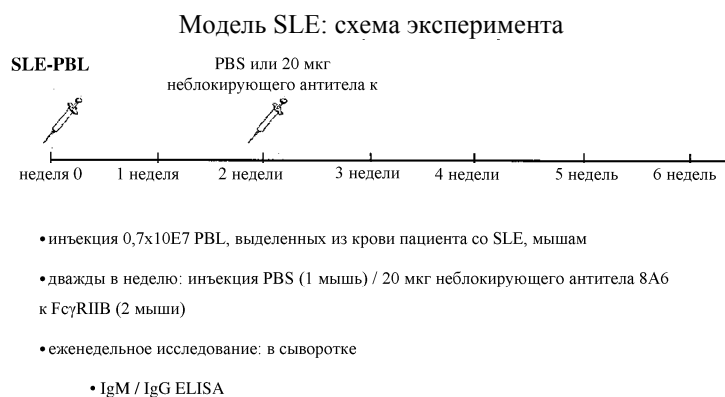
Клетки Daudi оставляли инкубироваться в течение 25 мин с буфером (необработанные) или со смесью (смесь антител), содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышинному IgG (кроличье). Затем клетки обрабатывали 20 мин либо 0,25 мкг/мл ch8A6_N297A, либо гуманизированными 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 = загрузочный контроль.

Сравнение гуманизированных вариантов 8A6 с ch8A6_N297A, 2B6 и chGB3_N297A



Фиг. 11. Анализ фосфорилирования ITIM

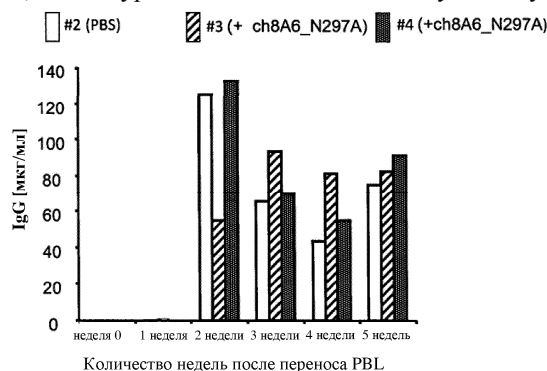
Клетки Daudi оставляли инкубироваться в течение 25 мин с буфером (необработанные) или со смесью (смесь антител), содержащей антитело к IgM (мышинное антитело к иммуноглобулину человека) и антитело к мышиному IgG (кроличье). Затем клетки обрабатывали 20 мин любым из 0,25 мкг/мл ch8A6_N297A, гуманизированных вариантов 8A6 hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/VH10+VL7/-VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7), блокирующего антитела 2B6 или chGB3_N297A. Клетки собирали после инкубирования и лизировали в соответствии с протоколом. Лизаты подвергали WB-анализу. β-актин = загрузочный контроль.



Фиг. 12. Схема эксперимента для мышиной модели SLE-PBL. PBL от пациентов-людей со SLE переносят в иммунодефицитных мышей

PBL-клетки пересаживают и мышей впоследствии обрабатывают контролем (PBS) или антителом ch8A6_N297A к FcγRIIB согласно настоящему изобретению.

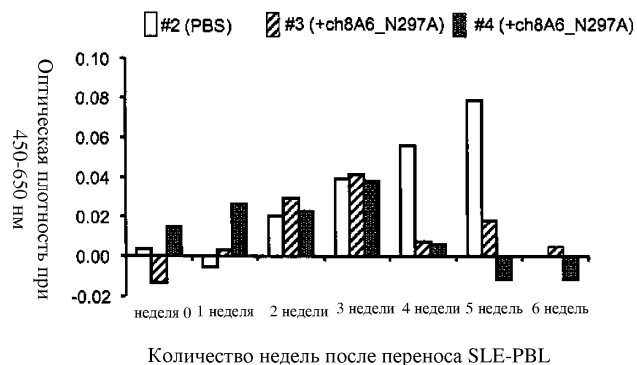
Модель SLE-PBL, общий уровень человеческого иммуноглобулина в сыворотке



Фиг. 13. Общий уровень человеческого IgG [мкг/мл] у мышей, которым пересадили PBL от доноров-людей, страдающих от SLE

Описаны мыши, обработанные контролем (#2, PBS) или химерным 8A6 = ch8A6_N297A (#3 и #4), антителом к FcγRIIB, формат N297A. Не обнаружено значительных отличий в общем уровне человеческого IgG между PBS или антителом к FcγRNB.

Модель SLE-PBL, влияние на антитела к ДНК (специфический к заболеванию IgG)



Фиг. 14. Снижение уровня специфических к заболеванию человеческих антител IgG к ДНК у обработанных ch8A6_N297A мышей, начиная с 4 недели после переноса/пересадки SLE-PBL. Изображены титры антител IgG к ДНК у двух различных мышей, #3 и #4 (обработанные ch8A6_N297A), #2 показан контроль с PBS.

