

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090128 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.31

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

(22) Дата подачи заявки
2013.12.10

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

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

(32) 2012.12.10; 2013.02.11

(33) US

(62) 201591113; 2013.12.10

(71) Заявитель:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

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

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

(57) В изобретении раскрыты антитела и фрагменты антител, которые связываются с BDCA2. Также описаны способы применения антител и фрагментов антител для индукции гибели плазматоидных дендритных клеток, ингибирования продукции или секреции воспалительных цитокинов и хемокинов и для лечения или профилактики иммунологических заболеваний, таких как воспалительные и аутоиммунные состояния.

202090128

A2

A2

202090128

АНТИТЕЛА ПРОТИВ АНТИГЕНА 2 ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

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

Уровень изобретения

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

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере отчасти, на идентификации и определении свойств антител, которые связываются с BDCA2. Такие антитела могут уменьшать или ингибировать секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов. Антитела против BDCA2 по изобретению также способны истощать клетки pDC посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC). Дополнительно антитела против BDCA2 по изобретению могут снижать уровни CD32a и/или CD62L на поверхности клеток pDC. Кроме того, антитела против BDCA2 по

изобретению могут опосредовать интернализацию BDCA2 из клеточной поверхности pDC. По меньшей мере этим обусловлена эффективность антител против BDCA2 по изобретению, для лечения или профилактики аутоиммунных и воспалительных заболеваний. В настоящем описании также показано, что антитела против BDCA2 по изобретению можно комбинировать с противомаларийным средством для улучшения эффектов.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и конкурирует с ВІІВ059 за связывание с внеклеточным доменом BDCA2 человека.

Антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с ВІІВ059 за связывание с BDCA2, если антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент перед связыванием с BDCA2 полностью или частично ингибирует последующее связывание с ВІІВ059 в BDCA2. Например, антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует с ВІІВ059 за связывание с BDCA2, если антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент перед связыванием с BDCA2 полностью ингибирует последующее связывание ВІІВ059 с BDCA2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент перед связыванием с BDCA2 вызывает ингибирование последующего связывания ВІІВ059 с BDCA2 по меньшей мере на 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или на 99%.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и (i) ингибирует секрецию интерферонов I типа и/или интерферонов III типа в дополнение к другим цитокинам и хемокинам из плазмоцитоидных дендритных клеток; или (ii) индуцирует или усиливает истощение плазмоцитоидных дендритных клеток *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 подавляет CD32a и/или CD62L на поверхности pDC. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2

опосредует интернализацию BDCA2 с клеточной поверхности pDC. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с BDCA2 обезьян циномолгус (SEQ ID NO:72) и с BDCA2 резусов (SEQ ID NO:72). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует секрецию или продукцию интерферона I типа, интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухолей α (ФНО- α), интерферона III типа, макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1)- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, лиганда 5 хемокина (мотив C-C) (CCL5/RANTES) или белка-10, индуцируемого интерфероном γ (IP10/CXCL10).

В некоторых вариантах осуществления двух вышеуказанных аспектов выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент необязательно дополнительно содержит или состоит из одного, двух, трех, четырех, пяти или шести следующих признаков: EC₅₀ (BDCA2 человека) составляет от 0,5 до 3 мкг/мл или от 4 до 10 нМ; EC₅₀ (BDCA2 обезьян циномолгус) составляет от 0,5 до 3 мкг/мл или от 5 до 10 нМ; pI составляет от 7 до 7,5; не связывается с Clec4b2 крысы или связывается с Clec4b2 крысы с более низкой аффинностью связывания, чем с BDCA2 человека, макака резус или циномолгус; ингибирует продукцию или секрецию хемокинов, таких как (MIP-1)- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, CCL5/RANTES, IP10/CXCL10; имеет область, определяющую комплиментарность (CDR), а именно CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, или аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8; CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10; и CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11; и переменная тяжелая цепь содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89; CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:91; и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9; CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:92; и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90; CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:93; и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:94. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет EC_{50} (BDCA2 человека), значение которой составляет 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 или 5,5 нМ. В конкретном варианте осуществления EC_{50} (BDCA2 человека) выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 4,9 нМ. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет EC_{50} (BDCA2 циномолгуса), значение которой составляет 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 нМ. В конкретном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет EC_{50} 4,4 нМ (BDCA2 циномолгуса). В некоторых вариантах осуществления этого аспекта указанное антитело имеет константную область тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором,

гликозилирование антитела, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG антитело. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи. CDR1 тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR2 тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10) или из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR3 тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:91 с

заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:92 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:93 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:94 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. Эти антитела (i) связываются с BDCA2 человека или обезьян циномолтус, но не проявляют значительного связывания с BDCA2 от филогенетических видов указанных ниже приматов; и/или (ii) ингибируют интерферон I типа, индуцируемый TLR7/TLR9 и продукцию других цитокинов или хемокинов pDC человека; и/или (iii) опосредуют интернализацию BDCA2 с поверхности pDC; и/или (iv) подавляют CD32a и/или CD62L с поверхности pDC; и/или (v) истощают pDC *in vitro* посредством ADCC или CDC. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта указанное антитело имеет константную область тяжелой цепи и легкой цепи человека.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающийся с BDCA2 человека, имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 с

заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10), или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11) или аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:11 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях; CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной

последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10); CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11); CDR1 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5); CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6); и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который селективно связывается с BDCA2 человека, содержит CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TYTMS (SEQ ID NO:8), или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TYTMS (SEQ ID NO:8); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TYTMS (SEQ ID NO:8); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID

NO:10); CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11); CDR1 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5); CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6); и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, селективно связывающийся с BDCA2 человека, содержит CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTY (SEQ ID NO:89) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SPGDSFG (SEQ ID NO:91) аминокислотной или последовательности SEQ ID NO:91 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTY (SEQ ID NO:89); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SPGDSFG (SEQ ID NO:91); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR2 легкой цепи

содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной или двух положениях аминокислот. В других вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTY (SEQ ID NO:89); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SPGDSFG (SEQ ID NO:91); CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11); CDR1 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5); CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6); и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, селективно связывающийся с BDCA2 человека, содержит CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS

(SEQ ID NO:9) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYY (SEQ ID NO:92) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:92 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYY (SEQ ID NO:92); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи CDR3и легкой цепи. CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной, двух, трех или четыре аминокислотных положениях. CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. В некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 легкой цепи, которая

содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYY (SEQ ID NO:92); CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11); CDR1 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5); CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO:6); и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO:7).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, селективно связывающийся с BDCA2 человека, содержит CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности STYTMS (SEQ ID NO:90) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности WVATISPGDSFGYY (SEQ ID NO:93) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:93 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TRDIYYNYGAWFA (SEQ ID NO:94) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:94 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая

содержит или состоит из аминокислотной последовательности STYTMS (SEQ ID NO:90); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности WVATISPGDSFGYY (SEQ ID NO:93); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TRDIYYNYGAWFA (SEQ ID NO:94). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности DYDGDSYMNWY (SEQ ID NO:95) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:95 с заменой в одной, двух, трех или четырех аминокислотных положениях. CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности LLIYAASLE (SEQ ID NO:96) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:96 с заменой в одной, двух, трех или четырех положениях аминокислот. CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPR (SEQ ID NO:97) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:97 с заменой в одной, двух, трех или четырех положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности DYDGDSYMNWY (SEQ ID NO:95) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:95 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности LLIYAASLE (SEQ ID NO:96) или аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:96 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях; и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPR (SEQ ID NO:97) или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:97 с заменой в одной или двух аминокислотных положениях. В других вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности STYTMS (SEQ ID NO:90); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности WVATISPGDSFGYY (SEQ ID NO:93); CDR3 тяжелой

цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TRDIYYNYGAWFA (SEQ ID NO:94); CDR1 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DYDGDSYMNWY (SEQ ID NO:95); CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности LLIYAASTLE (SEQ ID NO:96); и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPR (SEQ ID NO:97).

В некоторых вариантах осуществления указанных выше аспектов антитело имеет константные области тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc рецептором, гликозилирование антител, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплимента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG 1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3

тяжелой цепи из VH, которая представлена в какой-либо из последовательностей SEQ ID NO:40, 42, 44, 46, 49 или 52. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи из VL, которая представлена в какой-либо из последовательностей SEQ ID NO:54, 56 или 58. Области CDR могут представлять собой CDR согласно нумерации по Kabat или любые альтернативные области CDR. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет константные области тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько следующих свойств: связывание с Fc рецептором, гликозилирование антитела, число цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток или функции комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG антитело. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 80% идентична

аминокислотной последовательности домена VH BIIB059 (SEQ ID NO:24) или домена VH, представленного в какой-либо из SEQ ID NO:40, 42, 44, 46, 49 или 52. Эти антитела (i) связываются с BDCA2 человека или обезьяны циномолгус, но незначительно связываются с BDCA2 филогенетических видов нижеуказанных приматов; и/или (ii) ингибируют интерферон I типа, индуцируемый TLR7/TLR9, и продукцию других цитокинов или хемокинов из человеческих клеток pDC; и/или (iii) опосредуют интернализацию BDCA2 с поверхности pDC; и/или (iv) подавляют CD32a и/или CD62L на поверхности pDC; и/или (v) истощают клетки pDC in vitro посредством ADCC или CDC.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или фрагмент такого антитела содержит или состоит из домена VH, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности домена VH BIIB059 (SEQ ID NO:24), или домена VH, представленного в какой-либо из последовательностей SEQ ID NO:40, 42, 44, 46, 49 или 52. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или фрагмент такого антитела содержит или состоит из домена VH, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности домена VH BIIB059 (SEQ ID NO:24), или домена VH, представленного в какой-либо одной из SEQ ID NO:40, 42, 44, 46, 49 или 52. В других вариантах осуществления этого аспекта домен VH выделенного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент идентичен аминокислотной последовательности домена VH BIIB059 (SEQ ID NO:24) или домена VH, представленного в какой-либо из последовательностей SEQ ID NO:40, 42, 44, 46, 49 или 52. В некоторых вариантах осуществления тяжелой цепь содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из переменного домена легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности домена VL BIIB059 (SEQ ID NO:23), или домена VL какой-либо одной из SEQ ID NO:54, 56 или 58. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

или состоит из домена VL, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности домена VL BIIB059 (SEQ ID NO:23), или домена VL, указанного в любой из SEQ ID NO:54, 56 или 58. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из домена VL, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности домена VL BIIB059 (SEQ ID NO:23), или домена VL какой-либо одной из SEQ ID NO:54, 56 или 58. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из домена VH, который идентичен аминокислотной последовательности домена VH BIIB059 (SEQ ID NO:24), и домена VL, который идентичен аминокислотной последовательности домена VL из BIIB059 (SEQ ID NO:23). В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из домена VH, который идентичен аминокислотной последовательности домена VH, указанного в какой-либо из SEQ ID NO:40, 42, 44, 46, 49 или 52, и домена VL какой-либо одной из SEQ ID NO:54, 56 или 58. В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4, и легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3. Эти варианты осуществления относятся ко всем вышеуказанным аспектам и их вариантам. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является одноцепочечным антителом. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой поликлональное антитело, химерное антитело, F_{ab}-фрагмент, F_{(ab')₂}-фрагмент, F_{ab'}-фрагмент, F_{sc}-фрагмент, F_v-фрагмент, scFv, sc(Fv)₂ или диатело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет

константную область тяжелой цепи IgG1.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в АТСС под идентификационным номером РТА-13450. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в АТСС под идентификационным номером РТА-13450. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта указанное антитело имеет константные области тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, то такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором, гликозилирование антител, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. В другом аспекте изобретение относится к выделенному

антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и содержит варианты CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в ATCC под идентификационным номером PTA-13450, при этом варианты CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи включают одну, две или три аминокислотные замены по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, соответственно, антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в ATCC под идентификационным номером PTA 13450. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит варианты CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в ATCC под идентификационным номером PTA-13450, при этом варианты CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи включают одну, две или три аминокислотные замены по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в ATCC под идентификационным номером PTA-13450. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта указанное антитело имеет константные области тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, то такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором, гликозилирование антител, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до

15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и перекрестно блокирует связывание антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в ATCC под идентификационным номером PTA-13450. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. Еще в одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) в том же эпитопе, что и антитело, которое продуцируется гибридомой, депонированной в ATCC под идентификационным номером PTA-13450. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В

некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO:1) и содержит домен VH, который по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 98% идентичен VH домену из антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в АТСС под идентификационным номером РТА-13450. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VL, который по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 98% идентичен домену VL из антитела, которое продуцируется гибридомой, депонированной в АТСС под идентификационным номером РТА-13450.

Во всех вышеуказанных пяти аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно: (i) ингибирует секрецию интерферонов I типа и/или интерферонов III типа в дополнение к другим цитокинам и хемокинам из плазмоцитоидных дендритных клеток; или (ii) индуцирует или усиливает истощение плазмоцитоидных дендритных клеток *in vitro*. В некоторых

вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов это антитело подавляет CD32a и/или CD62L на pDC (по сравнению с плазмоцитоидной дендритной клеткой, которая не контактирует с антителом против BDCA2). В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует интернализацию BDCA2 с поверхности клеток pDC. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с BDCA2 обезьян циномолгус (SEQ ID NO:72) и с BDCA2 резусов (SEQ ID NO:72). В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует секрецию или продукцию интерферона I типа, интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухолей α (ФНО- α), интерферона III типа, макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1)- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, лиганда 5 хемокина (мотив C-C) (CCL5/RANTES) или белка-10, индуцируемого интерфероном γ (IP10/CXCL10). В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело. В других вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой поликлональное антитело, химерное антитело, F_{ab}-фрагмент, F_{(ab')₂}-фрагмент, F_{ab'}-фрагмент, F_{sc}-фрагмент, F_v-фрагмент, scFv, sc(Fv)₂ или диатело. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело IgG2 имеет константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело IgG4 имеет константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело

представляет собой гибрид из константных областей тяжелой цепи IgG1 и IgG4.

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

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

В другом аспекте изобретение относится к способу получения антитела против BDCA2. Способ включает получение клетки, содержащей тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела BDCA2, инкубацию этой клетки в условиях, которые позволяют экспрессию антитела, и выделение антитела. Способ дополнительно содержит очистку антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку 293. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой B1IB059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:4, и легкая цепь содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO:3. В другом варианте антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из CDR1 VH,

содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, CDR2 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, и CDR3 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из CDR1 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, CDR2 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, CDR3 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11, CDR1 VL, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5, CDR2 VL, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, и CDR3 VL, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7.

В другом аспекте изобретение относится к способу обнаружения присутствия плазмоцитоидных дендритных клеток в ткани. Способ содержит контактирование ткани с антителом против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего системной красной волчанкой. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего склеродермией. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего кольцевидной склеродермой. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего ревматоидным артритом. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего псориазом. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего дерматомиозитом. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего полимиозитом. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой биоптат кожи от индивида, страдающего воспалительной болезнью кишечника. В конкретных вариантах осуществления системная красная волчанка представляет собой

кожную волчанку, дискоидную волчанку или волчаночный нефрит. Антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть мечены, например, флуорофором (например, Alexa Fluor 647). В некоторых вариантах осуществления анти-антитело BDCA2 представляет собой ВІІВ059. В других вариантах осуществления изобретения антитело анти-BDCA2 представляет собой клон 124В3.13 (дендритные клетки). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно содержит контактирование ткани с анти-CD123 антителом.

В другом аспекте изобретение относится к способу индукции гибели плазмоцитоидных дендритных клеток у нуждающегося в этом индивида. Способ включает введение индивиду какого-либо из антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, или контактирование плазмоцитоидных дендритных клеток, который экспрессирует BDCA2, с каким-либо из антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к способу уменьшения продукции воспалительных цитокинов или хемокинов плазмоцитоидными дендритными клетками у нуждающегося в этом индивида. Способ содержит введение индивиду эффективного количества какого-либо из антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, или контактирование плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих BDCA2, с эффективным количеством какого-либо из антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления воспалительные цитокины или хемокины выбирают из группы, состоящей из: интерферона I типа, ИЛ-6 или ФНО- α , интерферона III типа, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, CCL5/RANTES или IP10/CXCL10.

В другом аспекте изобретение относится к способу подавления экспрессии CD32a на поверхности плазмоцитоидных дендритных клеток. Способ содержит контактирование плазмоцитоидных дендритных клеток с антителами против BDCA2, описанными в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 имеет константную область

тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гибрид из константных областей тяжелой цепи IgG1 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело является α-гликозилированным. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой α-гликозилированный гибрид из константных областей тяжелой цепи IgG1 и IgG4.

В другом аспекте изобретение относится к способу понижающей регуляции экспрессии CD32a (FcγRIIa) на поверхности плазматоидных дендритных клеток у нуждающегося в этом индивида-человека. Способ содержит введение человеку эффективного количества антител против BDCA2 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 имеет константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гибрид из константных областей тяжелых цепей IgG1 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело является α-гликозилированным. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой α-гликозилированный гибрид из константных областей тяжелой цепи IgG1 и IgG4.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования стимуляции плазматоидных дендритных клеток с помощью иммунных комплексов у нуждающегося в этом индивида-человека. Способ содержит введение человеку эффективного количества антител против BDCA2 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления такое введение снижает уровень CD32a на поверхности клеток pDC. В некоторых вариантах индивид имеет гиперчувствительность III типа. В одном из вариантов осуществления индивид-человек страдает системной красной

волчанкой (СКВ). В другом варианте осуществления человек страдает ревматоидным артритом. Еще в одном из вариантов осуществления человек страдает синдромом Шегрена. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 имеет константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гибрид из константных областей тяжелых цепей IgG1 и IgG4.

В другом аспекте изобретение относится к способу понижающей регуляции экспрессии (или терминальной стадии тромбоцитопоза-шеддинга CD62L (L-селектина) на поверхности плазмоцитоидных дендритных клеток у нуждающегося в этом человека. Способ содержит введение индивиду-человеку эффективного количества антитела против BDCA2 или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении. В конкретных вариантах осуществления введение антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента повышает уровень одной или нескольких металлопротеиназ. В некоторых вариантах осуществления подавление CD62L происходит посредством расщепления металлопротеиназы. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 имеет константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных пяти аспектов антитело представляет собой гибрид из константных областей тяжелой цепи IgG1 и IgG4.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом индивида. Способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества любого из описанных в изобретении антител против BDCA2 или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание

выбирают из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ), кожной волчанки, дискоидной волчанки, волчаночного нефрита, ревматоидного артрита, воспалительной болезни кишечника, системного склероза, кольцевидной склеродермы, псориаза, диабета типа I, дерматомиозита, полимиозита и болезни Шегрена. В одном конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является СКВ. В другом конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является дискоидная волчанка. Еще в одном конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является волчаночный нефрит. В другом конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является кожная волчанка. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет генерализованую СКВ. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет СКВ умеренной степени тяжести. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет умеренную СКВ без тяжелого активного вовлечения ЦНС и/или тяжелого активного вовлечения почек. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет умеренную СКВ с тяжелым активным поражением ЦНС и/или тяжелым активным поражением почек. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет кожные проявления СКВ (например, скуловую или дискоидную сыпь). В некоторых вариантах осуществления индивид страдает тяжелой формой СКВ. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет тяжелую форму СКВ без серьезного активного поражения ЦНС и/или тяжелого активного поражения почек. В некоторых вариантах осуществления индивид страдает тяжелой формой СКВ с тяжелым активным поражением ЦНС и/или тяжелым активным поражением почек. Системная красная волчанка в средней или тяжелой форме являются стадиями развития этого заболевания (смотрите, например, Руководство Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults, Arthritis & Rheumatism, 42(9): 1785-1795 (1999); Gladman, Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus, Curr. Opin. Rheumatol., 8:430-437 (1996); Kalunian et al., Definition, classification, activity and damage indices. В книге: Dubois' lupus erythematosus. 5th ed., Baltimore: Williams and Wilkins; стр. 19-30 (1997)).

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом индивида. Способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества любого из антител против BDCA2 или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, в любом из относящихся к способам вышеуказанных аспектов, индивидом является человек. В некоторых вариантах осуществления, в любом из относящихся к способам вышеуказанных аспектов, антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации по меньшей мере с одним из следующих средств: противомаларийное средство (например гидроксихлорохин), ингибитор сигнального пути TLR7, ингибитор сигнального пути TLR9 или кортикостероид. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелой и легкой цепей B1IB059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:8, 10 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:89, 91 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:9, 92 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:90, 93 и 94, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:95, 96 и 97, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 дополнительно содержит Fc-область, которая связывается с CD32a с EC₅₀ по меньшей мере приблизительно от 7 до 15 мкг/мл (например 10, 11, 12 мкг/мл). В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой B1IB059.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей противомаларийное средство (например,

гидроксихлорохин) и антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелых цепей (или альтернативные CDR) SEQ ID NO:24. В другом варианте антитело против BDCA2 содержит CDR легких цепей (или альтернативные CDR) SEQ ID NO:23. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелых и легких цепей BIIIB059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:8, 10 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:89, 91 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:9, 92 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:90, 93 и 94, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:95, 96 и 97, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 дополнительно содержит Fc-область, которая связывается с CD32a с EC₅₀ по меньшей мере приблизительно от 7 до 15 мкг/мл (например 9, 10, 11, 12, 13, 14 мкг/мл). В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой BIIIB059.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей ингибитор сигнальных путей TLR7 и/или TLR9, и антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR тяжелых цепей (или альтернативные CDR) SEQ ID NO:24. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR легких цепей (или альтернативные CDR) SEQ ID NO:23. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелых и легких цепей BIIIB059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 содержит

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:8, 10 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:89, 91 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:9, 92 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:90, 93 и 94, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:95, 96, и 97, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 дополнительно содержит Fc-область, которая связывается с CD32a с EC₅₀ по меньшей мере приблизительно от 7 до 15 мкг/мл (например 10, 11, 12 мкг/мл). В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой BIIIB059.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей кортикостероид и антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелых цепей (или альтернативные CDR) SEQ ID NO:24. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR легких цепей (или альтернативные CDR) SEQ ID NO:23. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелой и легкой цепи BIIIB059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:8, 10 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:89, 91 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:9, 92 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3

легкой цепи SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:90, 93 и 94, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:95, 96 и 97, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 дополнительно содержит Fc-область, которая связывается с CD32a с EC₅₀ по меньшей мере приблизительно от 7 до 15 мкг/мл (например 9, 10, 11, 12, 13, 14 мкг/мл). В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой BIIIB059.

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

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

Краткое описание чертежей

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

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

Фиг.3 представляет диаграмму, показывающую связывание вариантов hu24F4 Hx/L1 с BDCA2 обезьян циномолгус.

Фиг.4 представляет собой схематическую карту плазмиды

pJP009, которая кодирует легкую цепь анти-BDCA2. Последовательность нуклеиновых кислот легкой цепи анти-BDCA2 находится под транскрипционным контролем промотора HCMV IE и последовательностей полиаденилирования hGH. Ген аминокликозид-фосфотрансферазы (устойчивости к неомицину) находится под транскрипционным контролем промотора фосфоглицеринкиназы мыши (muPGK) и последовательностей полиаденилирования. Остальные последовательности, включающие ген бета-лактамазы, предназначены для размножения и селекции в *E.coli*.

Фиг.5 представляет собой схематическую карту плазмиды pJP010, которая кодирует тяжелую цепь анти-BDCA2. Последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи анти-BDCA2 находится под транскрипционным контролем промотора HCMV IE и последовательностей полиаденилирования роста человека hGH. Ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) находится под транскрипционным контролем промотора SV40E и последовательностей полиаденилирования. Остальные последовательности, включающие в себя ген бета-лактамазы, предназначены для размножения и селекции в *E.coli*.

Фиг.6 представляет собой линейную диаграмму, показывающую связывание ВІІВ059 на плазмоцитойдных дендритных клетках обезьяны циномолгус (А) и человека (В). Цельную кровь обезьяны циномолгус (А) или человека (В) инкубировали на льду с разными концентрациями антитела ВІІВ059, меченного красителем Alexa647 (кружки) или человеческим изотипом IgG (квадраты). Данные были получены с использованием устройства LSRII-4 для цветной сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), и проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo и GraphPad Prism.

Фиг.7 представляет собой диаграмму, показывающую результаты анализа самоассоциации AlphaScreen. Обозначения: ромб = ВІІВ059, квадрат = 5с8 и треугольник = LT105.

Фиг.8 представляет собой диаграмму, показывающую результаты дифференциальной сканирующей флуорометрии по тестированию устойчивости ВІІВ059 в разных условиях. Эта диаграмма показывает данные при 150 мМ хлорида натрия и 250 мМ

сахарозы в зависимости от уровня pH.

Фиг.9 представляет собой диаграмму, показывающую влияние перемешивания в течение продолжительного времени на агрегацию. Агрегацию подавляли путем добавления Твин 80.

Фиг.10 представляет собой диаграмму, показывающую прямое связывание AC144 с поверхностным BDCA2 человека и обезьяны циномолгус.

Фиг.11 представляет собой серию диаграмм, показывающих результаты гель-хроматографического анализа слитых белков Fc.

Фиг.12 представляет собой диаграмму, показывающую влияние кальция на связывание ВІІВ059 с BDCA2. Связывание ВІІВ059 с BDCA2 усиливается путем добавления кальция, что дает сигнал, который примерно в 2 раза выше по сравнению с ЭДТА.

Фиг.13 представляет собой диаграмму, показывающую результаты ОСТЕТ-связывания ВІІВ059 с эктодоменами BDCA2 человека и обезьяны циномолгус.

Фиг.14 представляет собой диаграмму, показывающую, что ВІІВ059 мощно ингибирует ИФН α мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), стимулированных агонистом TLR9. Каждый символ представляет показатель половины ингибирующей концентрации (IC₅₀) из независимого эксперимента, вертикальные линии отображают стандартную ошибку средней величины (SEM).

Фиг.15 А-С представляют собой серию диаграмм, показывающих, что ВІІВ059 мощно ингибирует цитокины и хемокины цельной крови, стимулированной лигандом TLR9. Фиг.15А показывает ингибирование ИФН α с использованием гепаринизированной венозной крови здоровых доноров. Фиг.15В показывает ингибирование ИФН α с использованием цельной крови двух больных СКВ (верхние диаграммы) по сравнению с результатами использования цельной крови 2 здоровых доноров (нижние диаграммы). Фиг.15С предоставляет ряд гистограмм, показывающих, что лечение ВІІВ059 приводит к ингибированию большого массива цитокинов и хемокинов.

Фиг.16 представляет собой гистограмму, показывающую, что ВІІВ059 ингибирует экспрессию интерферона I типа.

Фиг.17 включает две линейных диаграммы, показывающих, что лигирование BDCA2 с ВІІВ059 ингибирует TLR9-индуцированную продукцию цитокинов в очищенных клетках рDC.

Фиг.18 представляет собой гистограмму, показывающую, что лигирование BDCA2 подавляет индукцию выработки ИФН α при СКВ в сыворотке крови, стимулированной плазмоцитоидными дендритными клетками.

Фиг.19А представляет собой диаграмму, показывающую интернализацию BDCA2 после лигирования с ВІІВ059. Фиг.19В представляет собой линейную диаграмму, показывающую, что интернализация не влияет на продукцию ИФН α , которая опосредована ингибированием ВІІВ059.

Фиг.20 представляет собой серию диаграмм, показывающих связывание ВІІВ059 с рецепторами Fc γ .

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

Фиг.22А-Д представляют собой серию диаграмм, показывающих, что ВІІВ059 опосредует уничтожение клеток посредством ADCC. В качестве мишени использовали клеточную линию CHO (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2). Уровень экспрессии BDCA2 на поверхности клеток CHO определяли с помощью FACS с использованием APC-меченного анти-BDCA2 моноклонального антитела (МКА) (клон AC144, Miltenyi). В качестве эффекторных клеток использовали клетки-натуральные киллеры (НК-клетки). Оценку ADCC проводили с помощью набора для анализа цитотоксичности Vybrant (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. В анализе выявляют глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу Г-6-ФД поврежденных клеток, на основе Г-6-ФД-зависимого восстановления резазурина, который после возбуждения при 530 нм, излучает флуоресценцию при 590 нм. Анализ ADCC, представленный на фиг.22А, проводили с использованием клеток CHO с высокой экспрессией BDCA2 (фиг.22С), а в анализе ADCC, представленном на фиг.22В, использовали клетки CHO с более низкой экспрессией BDCA2 (фиг.22Д).

Фиг.23 представляет собой диаграмму, показывающую, что ВІІВ059 опосредует уничтожение клеток посредством CDC. Клетки СНО (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2) высевали в количестве 5×10^4 клеток в 96-луночные коллагеновые планшеты с черными лунками и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Затем планшеты промывали и инкубировали с комплементом кроличьей сыворотки и пропидиййодидом (PI) в течение 1 часа при 37°C в присутствии эффекторных компетентных анти-BDCA2 моноклональных антител (24F4S и ВІІВ059), моноклональных антител с дефицитом эффекторной функции (24F4S-Agly и 24F4A-Agly) или контрольного изотипа IgG1. Отрицательный контроль состоял из лунок, содержащих клетки СНО, комплемент кроличьей сыворотки и PI, при отсутствии антител.

Фиг.24 представляет собой серию диаграмм, используемых для определения EC₅₀ при связывании ВІІВ059 ("прямом связывании") и конкурентном связывании ВІІВ059- α 647 ("непрямым") на плазмоцитоидных дендритных клетках обезьян циномолгус. Перед инъекцией ВІІВ059 *in vivo* у двенадцати обезьян циномолгус забирали кровь один раз в неделю в течение всего трех недель. Применяли проточную цитометрию для определения EC₅₀ при связывании ВІІВ059 с BDCA2 на поверхности клеток pDC ("прямой" способ), и определяли количество BDCA2 рецептора, доступного в присутствии ВІІВ059 ("непрямой" способ). Кровь инкубировали с шестикратным титрованием ВІІВ059 в диапазоне от 40 до 0,04 мкг/мл. Клетки pDC идентифицировали с помощью проточной цитометрии как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали или вторичным анти-человеческим IgG, меченным фикоэритрином (PE), или меченным ВІІВ059- α 647, в концентрации 10 мкг/мл. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) PE (незакрашенные обозначения, графически на левой оси ординат) или A647 (закрашенные обозначения, графически на правой оси ординат) рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (четырёх-параметрическая кривая нелинейной регрессионной аппроксимации логарифмически преобразованных

данных). В изобретении показаны репрезентативные диаграммы от четырех из двенадцати обезьян циномолгус.

Фиг.25 представляет собой репрезентативную диаграмму, показывающую плато связывания антитела против BDCA2 ВІІВ059 с BDCA2 на клеточной поверхности рDC в цельной крови обезьян циномолгус. Кровь инкубировали с шестикратным титрованием ВІІВ059 в диапазоне от 40 до 0,04 мкг/мл. Клетки рDC идентифицировали с помощью проточной цитометрии как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали вторичным анти-IgG человека, меченным фикоэритрином (PE). Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) PE и рассчитывали процент максимального связывания, используя значение в точке 40 мкг/мл как 100%. Каждая строка представляет данные от одной отдельной обезьяны циномолгус, в общей сложности использовали двенадцать обезьян циномолгус, и полученные данные графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (четырёх-параметрическая кривая нелинейной регрессионной аппроксимации логарифмически преобразованных данных). Окрашивание повторяли один раз в неделю всего в течение трех недель. Пунктирные линии показывают, что при концентрации ВІІВ059 10 мкг/мл связывание с рецептором BDCA2 было насыщенным у всех обезьян циномолгус.

Фиг.26А-С показывают уровни окрашивания связанного ВІІВ059 и свободного BDCA2 у обезьян циномолгус, которым вводили носитель. Фиг.26А представляет собой серию гистограмм FACS, показывающих исходное окрашивание PE у обезьян циномолгус после введения носителя. Обезьянам циномолгус №№ 1, 4 и 12 делали однократную внутривенную (в/в) инъекцию контрольного носителя (цитрат натрия) в точке времени 0. Через 1 час забирали цельную кровь и с помощью проточной цитометрии определяли рDC, как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, после чего обрабатывали их анти-человеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве контроля PE-флуоресценции минус один (FMO) (заштрихованные гистограммы). Фиг.26В представляет диаграмму PE-окрашивания рDC крови, полученной от трех обезьян циномолгус после введения носителя в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и

графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Фиг.26С представляет диаграмму окрашивания A647 клеток pDC крови обезьян циномолтус после введения носителя в указанные точки времени. В образцы крови обезьян циномолтус после введения носителя в указанные точки времени добавляли ВІІВ059-А647 в количестве 10 мкг/мл, и анализировали клетки pDC на А647-окрашивание. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Фиг.27А-С показывают, что связанные ВІІВ059 и рецептор BDCA2 становятся недоступными на поверхности клеток pDC обезьян циномолтус после однократного введения 10 мг/кг ВІІВ059. Фиг.27А представляет собой серию гистограмм FACS, показывающих окрашивание ВІІВ059 у обезьян циномолтус после введения 10 мг/кг ВІІВ059. Обезьянам циномолтус №№ 3, 8 и 10 делали однократную в/в инъекцию ВІІВ059 в дозе 10 мг/кг в точке времени 0. Через 1 час проводили забор цельной крови и клетки pDC идентифицировали как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, после чего их обрабатывали анти-человеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве PE-FMO контроля (заштрихованные гистограммы). Фиг.27В представляет собой диаграмму PE-окрашивания клеток pDC крови, полученной от трех обезьян циномолтус после введения ВІІВ059 в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Фиг.27С представляет диаграмму А647-окрашивания клеток pDC крови, полученной от трех обезьян циномолтус после введения ВІІВ059 в указанные точки времени. ВІІВ059-α647 в количестве 10 мкг/мл добавляли к крови, полученной от трех обезьян циномолтус после введения ВІІВ059 в каждой из указанных точек времени, и анализировали А647-окрашивание на клетках pDC. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Фиг.28А-С показывают, что связанные ВІІВ059 и рецептор

BDCA2 становятся недоступными на поверхности клеток pDC после однократного введения 1 мг/кг ВІІВ059 обезьянам циномолтус. Фиг.28А представляет серию гистограмм FACS, показывающих окрашивание ВІІВ059 у обезьян циномолтус после введения 1 мг/кг ВІІВ059. Обезьянам циномолтус №№ 3, 8 и 10 делали однократную в/в инъекцию ВІІВ059 в дозе 1 мг/кг в точке времени 0. Через 1 час проводили забор цельной крови, идентифицировали клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, после чего их обрабатывали анти-человеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве PE-FMO контроля (заштрихованные гистограммы). Фиг.28В представляет диаграмму PE-окрашивания клеток pDC крови, полученной от трех обезьян циномолтус после введения ВІІВ059 в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Фиг.28С представляет диаграмму окрашивания A647 клеток pDC крови, полученной от обезьян циномолтус, которым вводили ВІІВ059 в указанные точки времени. ВІІВ059- α 647 в количестве 10 мкг/мл добавляли в кровь, полученную от трех обезьян циномолтус после введения ВІІВ059 в каждой из указанных точек времени, и анализировали A647-окрашивание на клетках pDC. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Фиг.29А-С показывают, что связанные ВІІВ059 и рецептор BDCA2 становятся недоступными на поверхности клеток pDC после однократного подкожного (п/к) введения дозы 0,2 мг/кг ВІІВ059 обезьянам циномолтус. Фиг.29А представляет серию гистограмм FACS, показывающих окрашивание ВІІВ059 при п/к введении обезьянам циномолтус 0,2 мг/кг ВІІВ059. Обезьянам циномолтус №№ 4, 6 и 12 делали однократную подкожную инъекцию ВІІВ059 в дозе 0,2 мг/кг в точке времени 0. Через 1 час проводили забор цельной крови, идентифицировали клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали их анти-человеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве PE-FMO контроля (заштрихованные гистограммы). Фиг.29В представляет

диаграмму PE-окрашивания на клетках pDC крови, полученной от трех обезьян цинолтус после введения ВІІВ059 в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Фиг.29С представляет диаграмму A647-окрашивания на клетках pDC крови, полученной от трех обезьян цинолтус после введения ВІІВ059 в указанные точки времени. ВІІВ059-A647 в количестве 10 мкг/мл добавляли в кровь, полученную от трех обезьян цинолтус после введения ВІІВ059 в каждой их указанных точек времени, и анализировали A647-окрашивание на клетках pDC. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Фиг.30 представляет собой серию диаграмм, показывающих наблюдаемые фармакокинетические/фармакодинамические (ФК/ФД) корреляции у обезьян цинолтус, которым в/в вводили ВІІВ059 в дозе 1 мг/кг, и у обезьян цинолтус, которым в/в вводили ВІІВ059 в дозе 10 мг/кг. В каждой диаграмме на этой фигуре концентрация сывороточного ВІІВ059 показана на левой оси ординат (незакрашенные обозначения), и плотность BDCA2-рецептора показана на правой оси ординат (закрашенные обозначения). Ускоренный клиренс был выявлен у обезьяны цинолтус № 5, вероятнее всего, по причине иммуногенности к ВІІВ059.

Фиг.31 представляет собой серию диаграмм, показывающих наблюдаемые ФК/ФД корреляции у обезьян цинолтус, которым вводили ВІІВ059 п/к в дозе 0,2 мг/кг. В каждой диаграмме на этой фигуре концентрация сывороточного ВІІВ059 показана на левой оси ординат (незакрашенные обозначения), и плотность BDCA2-рецептора показана на правой оси ординат (закрашенные обозначения).

Фиг.32 представляет собой серию столбчатых гистограмм, показывающих результаты анализов ELISA или мультиплексных анализов для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов, продуцируемых клетками pDC, которые обработаны CpG-A, CpG-A в присутствии анти-BDCA2, и CpG-A в присутствии

контрольного изотипа. Каждый столбец представляет собой среднее значение и стандартное отклонение (SD) для дублированных лунок от репрезентативного здорового донора-человека из 5 испытуемых. Вертикальные линии обозначают SD.

Фиг.33 представляет собой серию столбчатых гистограмм, показывающих результаты анализов ELISA или мультиплексных анализов для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов, продуцируемых клетками pDC, которые были обработаны иммунными комплексами Sm/RNP, иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии анти-BDCA2 и иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии контрольного изотипа. Каждый столбец представляет собой среднее значение и стандартное отклонение (SD) для дублированных лунок от репрезентативного здорового донора-человека из 5 испытуемых. Вертикальные линии обозначают SD.

Фиг.34 представляет собой серию столбчатых гистограмм, показывающих результаты анализов количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) для определения эффекта BIIB059 на транскрипцию подтипов ИФН I типа в клетках pDC, стимулированных иммунным комплексом (IC) Sm/RNP, у здоровых доноров. Каждый столбец представляет собой среднее относительное кратное изменение с повторами в четырех лунках от репрезентативного донора из 3 испытуемых ($n=3$), и вертикальные линии обозначают стандартное отклонение (SD).

Фиг.35А показывает BIIB059-опосредованное дозозависимое ингибирование ИФН α , индуцированное TLR9, посредством PBMC от одного репрезентативного здорового донора-человека из 18 испытуемых. Каждое обозначение представляет собой среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Фиг.35В показывает BIIB059-опосредованное дозозависимое ингибирование ИФН α , индуцированное TLR9, посредством PBMC от одного репрезентативного больного СКВ из 11 испытуемых. Каждое обозначение представляет среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Фиг.35С показывает IC₅₀ для ингибирования с помощью BIIB059 TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством PBMC у здоровых доноров (ЗД) по сравнению с

больными СКВ (СКВ). Каждое обозначение относится к отдельному донору, вертикальные линии обозначают SD.

Фиг.36А показывает ВІІВ059-опосредованное дозозависимое ингибирование TLR9-индуцированного ИФН α одного репрезентативного анализа цельной крови от 12 испытуемых. Каждое обозначение представляет собой среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Фиг.36В показывает IC₅₀ для ингибирования с помощью ВІІВ059 TLR9-индуцированной продукции ИФН α в анализах цельной крови по сравнению с анализами PBMC. Каждое обозначение относится к отдельному донору, вертикальные линии обозначают SD.

Фиг.37. PBMC от здоровых доноров-людей были стимулированы с помощью 1 мкМ лиганда TLR3 (Poly I:C) и обработаны ВІІВ059 в концентрациях в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,5 нг/мл в общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку в 96-луночном планшете. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. 200 мкл супернатанта собирали для оценки уровней ИФН α с помощью анализа ELISA. Каждое обозначение представляет средние уровни ИФН α , полученные при каждом условии обработки. Показаны данные от двух независимых доноров. Вертикальные линии обозначают стандартное отклонение (SD).

Фиг.38А показывает дозозависимую ВІІВ059-опосредованную интернализацию BDCA2 от репрезентативного здорового донора-человека. Кружки обозначают MFI при 2D6-окрашивании, и при разных дозах ВІІВ059. Треугольник обозначает MFI от 2D6 в присутствии контрольного изотипа (максимальное окрашивание). Ромб обозначает MFI контроля FMO (фоновое окрашивание). Фиг.38В показывает значения EC₅₀ от ВІІВ059-индуцированной интернализации BDCA2 на клетках pDC в анализах цельной крови у здоровых доноров-людей (закрашенные кружки; n=10 доноров). Среднее значение EC₅₀ составляет 0,017±0,005 мкг/мл.

Фиг.39 представляет собой графическое изображение значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) при 2D6-FITC окрашивании клеток pDC CD14-CD20-HLA-DR+CD123+, дающих сигнал выше порогового значения. Изотип (iso) демонстрирует

максимальное окрашивание, FMO (контроль-флуоресценция минус один) состоит из коктейля FACS окрашивания минус 2D6-FITC, что представляет фоновое окрашивание. На этой фигуре показан репрезентативный эксперимент от 4 выполненных независимых экспериментов.

Фиг.40 представляет конфокальные изображения человеческих pDC, очищенных из периферической крови, и затем инкубированных с 10 мкг/мл ВІІВ059-АF647 (показано белым) при 4°C (слева) или при 37°C в 5% CO₂ (справа) в течение 15 минут. Распределение клеток ВІІВ059 оценивали с помощью конфокальной микроскопии, и репрезентативное изображение показано для каждого условия.

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

Фиг.42 представляет собой графическое изображение, показывающее, что значения EC₅₀ ВІІВ059-опосредованной интернализации BDCA2 коррелируют с показателями IC₅₀ ВІІВ059-опосредованного ингибирования TLR9-индуцированного ИФН α в анализах цельной крови (n=10). Значение R² составляет 0,57.

Фиг.43А показывает результаты, выраженные в виде среднего и стандартного отклонения (SD) коэффициентов колокализации Мандерса для локализации TLR9 в компартменте LAMP1+. Фиг.43В показывает результаты, выраженные в виде среднего отклонения и SD коэффициентов колокализации Мандерса для локализации ВІІВ059/BDCA2 в компартменте TLR9+. Фиг.43С показывает результаты, выраженные в виде среднего отклонения и SD коэффициентов колокализации Мандерса для локализации ВІІВ059/BDCA2 в компартменте LAMP1+. Каждое обозначение представляет отдельную клетку; горизонтальные линии представляют среднее отклонение, вертикальные линии представляют SD.

Фиг.44А представляет собой гистограмму репрезентативного эксперимента с цельной кровью, обработанной 10 мкг/мл ВІІВ059 (заштрихованная гистограмма), 10 мкг/мл контрольного изотипа

(пунктирная линия) или с цельной кровью, стимулированной лигандом TLR9, CpG- (сплошная линия). Фиг.44В представляет собой графическое изображение эффекта обработки ВІІВ059 цельной крови, что вызывает шеддинг CD62L (закрашенные квадраты). Незакрашенный квадрат обозначает обработку изотипом (10 мкг/мл). Эта фигура является репрезентативной для 3 независимых экспериментов.

Фиг.45 представляет собой графическое изображение поверхностной экспрессии CD62L, анализированной с помощью проточной цитометрии. Экспрессию CD62L измеряли в присутствии ВІІВ059 единственного, и в присутствии GM6001 в возрастающих концентрациях (обозначено кружками). Незаштрихованный квадрат обозначает обработку изотипом в качестве контроля (10 мкг/мл). Перевернутый треугольник обозначает ВІІВ059, обработанные контрольным ДМСО. Эта фигура является репрезентативной для 2 независимых экспериментов.

Фиг.46А представляет собой графическое изображение ВІІВ059 и 24F4A-Agly-опосредованной дозозависимой интернализации BDCA2 на поверхности клеток рDC одного репрезентативного здорового донора-человека (n=5). Клетки рDC от здоровых доноров-людей выделяли с использованием технологии двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Клетки рDC обрабатывали ВІІВ059 в возрастающих концентрациях (обозначено кружками) или антителом 24F4-Agly в α-гликозилированной форме (обозначено квадратами). Клетки также обрабатывали 10 мкг/мл контрольного изотипа (обозначено треугольником) и инкубировали в течение 16 часов при 37°C. Затем рDC окрашивали на поверхностную экспрессию BDCA2 и CD32. Фиг.46В является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, которые были обработаны 10 мкл/мл ВІІВ059 (заштриховано) или контрольным изотипом (обозначено пунктиром) (n=5). Фиг.46С является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, которые были обработаны α-гликозилированной формой 24F4-A в дозе 10 мкг/мл (заштриховано) или контрольным изотипом (обозначено пунктиром). Сплошная линия относится к неокрашенным

клеткам (n=5). Фиг.46D представляет собой графическое изображение ВІІВ059-опосредованной дозозависимой понижающей модуляции CD32 на поверхности клеток рDC от одного репрезентативного здорового донора-человека (n=5). Фиг.46Е является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, обработанных в течение 1 часа при 4°C в присутствии 10 мкг/мл ВІІВ059 (заштриховано), α -гликозилированной формы (обозначено пунктиром) или контрольного изотипа (обозначено точками). После инкубации проводили оценку рDC на поверхностную экспрессию CD32. Сплошная черная линия относится к неокрашенным клеткам (n=3). Фиг.46F является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, обработанных в течение 1 часа при 37°C в присутствии 10 мкг/мл ВІІВ059 (заштриховано), α -гликозилированной формы (обозначено пунктиром) или контрольного изотипа (обозначено точками). После инкубации проводили оценку рDC на поверхностную экспрессию CD32. Сплошная черная линия относится к неокрашенным клеткам (n=3).

Фиг.47A представляет собой графическое изображение уровней ИФН α из выделенных рDC, которые были обработаны ВІІВ059 в возрастающих концентрациях (квадраты), α -гликозилированной формой антитела 24F4-A в возрастающих концентрациях (кружки), или контрольным изотипом в количестве 10 мкг/мл (треугольники). Клетки рDC стимулировали в присутствии CpG-A (75 мкг/мл) или оставляли без стимуляции (перевернутый треугольник). Клетки рDC инкубировали в течение 16 часов при 37°C, собирали супернатанты и анализировали на ИФН α с помощью ELISA. Показан репрезентативный эксперимент из 2 выполненных анализов. Фиг.47B представляет графическое изображение уровней ИФН α в выделенных рDC после их обработки ВІІВ059 в возрастающих концентрациях (квадраты), α -гликозилированной формой антитела 24F4-A в возрастающих концентрациях (кружки), контрольным изотипом в количестве 10 мкг/мл (треугольники) или анти-CD32 человеческим мАт (моноклональным антителом) в количестве 10 мкг/мл. Предварительно получали иммунные комплексы (IC) Sm/RNP путем смешивания SM-RNP из тимуса теленка и анти-RNP антител,

очищенных из сыворотки больных СКВ, в течение 30 минут в бессывороточной среде. Выделенные клетки стимулировали иммунными комплексами или обрабатывали только антигеном (без стимуляции). Клетки инкубировали в течение 16 часов при 37°C, собирали супернатанты и анализировали на ИФН α с помощью ELISA. На фигуре показан репрезентативный анализ из 3 проведенных анализов. Каждое обозначение представляет собой среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок.

Фиг.48А представляет собой столбчатую гистограмму, показывающую экспрессию CD32 на выделенных pDC, которые обработали иммунными комплексами в присутствии 10 мкг/мл ВІІВ059, 24F4-А, анти-CD32 мАт (клон АТ10), гуманизированным анти-CD40-антителом или контрольным изотипом. Клетки инкубировали в течение 16 часов при 37°C. pDC окрашивали на поверхностную экспрессию CD32 и CD40. Фиг.48В представляет столбчатую гистограмму, на которой показаны уровни ИФН α , измеренные с помощью ELISA в супернатантах, собранных в А. Показано репрезентативное изображение (n=3). Фиг.48С представляет гистограмму, показывающую экспрессию CD40 на поверхности pDC. Пунктирная линия обозначает экспрессию CD40 на поверхности клеток. Заштрихованная гистограмма представляет уровни CD40 на pDC после обработки анти-CD40-антителом. Сплошная линия относится к неокрашенным клеткам.

Фиг.49 показывает влияние гидроксихлорохина (HCQ) на потенциал ВІІВ059. Каждое обозначение представляет концентрации ИФН α , измеренные у отдельных здоровых доноров-людей, вертикальные линии обозначают SD. Клетки PBMC от здоровых доноров были обработаны ВІІВ059 единственным в разных концентрациях, HCQ единственным или комбинацией (ВІІВ059 + HCQ), при общем анализируемом объеме 250 мкг на лунку. Концентрации ВІІВ059 варьировались от 10 мкг/мл до 0,1 нг/мл. Концентрации HCQ варьировались от 10 мкМ до 156 нМ. Клетки PBMC в количестве 1×10^6 на лунку стимулировали 5 мкМ лиганда TLR7 (R848). Планшеты, содержащие PBMC, инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. Собирали 200 мкл

супернатантов для оценки в анализе ИФН α ELISA (PBL InterferonSource).

Фиг.50 показывает влияние HCQ на потенциал ВІІВ059. Каждое обозначение представляет концентрации ИФН α , измеренные у репрезентативного донора из 2 тестированных здоровых доноров, вертикальные линии обозначают стандартное отклонение (SD). Клетки PBMC из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров и больных СКВ выделяли путем прерывистого градиентного центрифугирования с Фиколлом, промывали в фосфатно-буферном растворе (ФБР) и ресуспендировали в полной культуральной среде (RPMI с 3% эмбриональной бычьей сывороткой-FBS). Клетки PBMC обрабатывали ВІІВ059 единственным в разных концентрациях, HCQ единственным или комбинацией (ВІІВ059 + HCQ), при общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку. Концентрации ВІІВ059 варьировались от 10 мкг/мл до 0,1 нг/мл. Концентрации HCQ варьировались от 10 мкМ до 156 нМ. Клетки PBMC в количестве 1×10^6 на лунку стимулировали 1 мкМ лиганда TLR9 (CPG-A). Планшеты, содержащие PBMC, инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. Собирали 200 мкл супернатантов для оценки в анализе ИФН α ELISA (PBL InterferonSource).

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

Фиг.52 представляет собой графическое изображение процента циркулирующих pDC (по логарифмической шкале) в цельной крови здоровых обезьян циномолгус в разные точки времени перед внутривенной инъекцией ВІІВ059. В указанные точки времени

проводили забор цельной крови, и путем проточной цитометрии определяли клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент клеток pDC рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo и графически отображали с помощью программного обеспечения R.

Фиг.53 демонстрирует конечную подогнанную модель, соответствующую проценту циркулирующих pDC (по логарифмической шкале) в цельной крови здоровой обезьяны циномолгус в разные точки времени перед в/в инъекцией ВІІВ059. Линейная модель со смешанными эффектами для логарифмического значения (% pDC) в разные точки времени в качестве фиксированных факторов и обезьян циномолгус в качестве случайных отрезков, показывает отсутствие различий между соотношениями геометрических средних значений % pDC, измеряемых по недельным различиям (p-значение на основе F-теста для всех временных эффектов, равных нулю, составляет 0,67). Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием языка R для статистических расчетов. Сплошная линия обозначает конечную подогнанную модель, которая включает только фиксированный отрезок и случайные отрезки для обезьян циномолгус. Был использован пакет lme4 в языке R для соответствия линейной модели со смешанными эффектами.

Фиг.54 обозначает процент циркулирующих pDC по логарифмической шкале до и после в/в введения обезьянам циномолгус дозы цитрата натрия как носителя, ВІІВ059 в дозе 1 мг/кг или ВІІВ059 в дозе 10 мг/кг. Дозы вводили в точке времени 0 трем обезьянам циномолгус в каждой группе. В указанные точки времени забирали цельную кровь и способом проточной цитометрии идентифицировали клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент клеток pDC рассчитывали в программном обеспечении FlowJo и графически с помощью программного обеспечения R.

Фиг.55 обозначает конечную подогнанную модель процентов циркулирующих pDC по логарифмической шкале до и после в/в введения обезьянам циномолгус дозы цитрата натрия как носителя, 1 и 10 мг/кг ВІІВ059. Использовали линейную модель со смешанными эффектами для логарифмических (% pDC) значений с

фиксированными факторами для группы по дозе, значений времени 1 час, 6 часов и более 28 дней, и со случайным отрезком для обезьян циномолтус. Сплошная линия обозначает конечную подогнанную модель. Был использован пакет lme4 в языке R для соответствия линейной модели со смешанными эффектами. Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием языка R для статистических расчетов.

Фиг.56 показывает процент циркулирующих pDC после п/к введения обезьянам циномолтус ВІІВ059 в дозе 0,2 мг/кг. Обезьянам циномолтус №№ 4, 6 и 12 проводили однократную подкожную инъекцию ВІІВ059 в дозе 0,2 мг/кг в точке времени 0. Обезьяне циномолтус № 6 из этих трех обезьян в предыдущем исследовании вводили ВІІВ059. Обезьянам циномолтус №№ 4 и 12 в предыдущем исследовании вводили носитель. В указанные моменты времени проводили забор цельной крови и способом проточной цитометрии идентифицировали pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент клеток pDC рассчитывали в программном обеспечении FlowJo, и графически с помощью программного обеспечения R.

Фиг.57 обозначает конечную подогнанную модель процентов циркулирующих pDC по логарифмической шкале после п/к введения обезьянам циномолтус ВІІВ059 в дозе 0,2 мг/кг. Использовали линейную модель со смешанными эффектами для логарифмических (% pDC) значений с фиксированными эффектами для непрерывного времени и точки времени 1 час, и со случайным отрезком для обезьян циномолтус. Сплошная линия обозначает конечную подогнанную модель. Был использован пакет lme4 в языке R для соответствия линейной модели со смешанными эффектами. Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием языка R для статистических расчетов.

Фиг.58 является схематическим представлением схемы ФК/ФД эксперимента с обезьянами циномолтус. Исследование с внутривенным (в/в) введением завершили девять обезьян циномолтус. У обезьян циномолтус брали кровь до и после внутривенного введения носителя, 1 мг/кг ВІІВ059 или 10 мг/кг ВІІВ059 в соответствии с показанной схемой забора крови. После завершения этого исследования 3 обезьяны циномолтус продолжили

участие в исследовании с подкожным (п/к) введением дозы, в котором они получали однократную подкожную инъекцию 0,2 мг/кг ВІІВ059. Во время каждого забора крови проводили анализ цельной крови, при этом цельную кровь обезьян циномолгус разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали CpG-A до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 18-20 часов. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифугировали для получения сыворотки. В биоанализе MxA клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 19-20 часов при 37°C и 5% CO₂, чтобы индуцировать белок MxA. Через 20 часов клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка MxA. Выполняли обратный расчет уровней ИФН α (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами rИФН α .

Фиг.59 представляет собой графическое представление тенденции к снижению TLR9-индуцированной продукции ИФН α у обезьян циномолгус, получавших однократную внутривенную дозу ВІІВ059, по сравнению со средними показателями перед введением. Цельную кровь обезьян циномолгус, получивших однократную внутривенную дозу носителя, 1 мг/кг ВІІВ059 или 10 мг/кг ВІІВ059, разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали CpG-A (2216) до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур, и инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 18-20 часов. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифугировали для получения сыворотки. Клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 18-20 часов при 37°C и 5% CO₂ для индуцирования белка MxA. Через 20 часов клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка MxA. Выполняли обратный расчет уровней ИФН α (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами rИФН α . Среднюю концентрацию ИФН α перед забором крови

рассчитывали для каждой обезьяны путем усреднения всех измерений ИФН α в точках времени перед забором крови (дни 21, 14, 7 и точке времени 0). Затем рассчитывали % ИФН α для каждой точки времени забора крови после введения ВІІВ059 до дня 14 путем деления концентрации ИФН α , установленной на тот момент, на средний показатель для этого животного перед забором крови, и умножения на 100. Получали усредненные значения для каждой группы введения. Диаграммы обозначают среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего отклонения. Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием программного обеспечения Excel и GraphPad 6.0 (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния).

Фиг.60 представляет собой графическое изображение уменьшенной TLR9-индуцированной продукции ИФН α в анализе *ex vivo* цельной крови обезьян циномолгус, получавших внутривенно ВІІВ059. Цельную кровь обезьян циномолгус, получивших однократную внутривенную дозу носителя (верхняя диаграмма), 1 мг/кг ВІІВ059 (средняя диаграмма) или 10 мг/кг ВІІВ059 (нижняя диаграмма), разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали СРG-A (2216) до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 18-20 часов. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифуговали для получения сыворотки. Клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 19-20 часов при 37°C и 5% CO₂, чтобы индуцировать белок МхА. Через 20 часов клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка МхА. Выполняли обратный расчет уровней ИФН α (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами rИФН α . Двусторонний дисперсионный анализ смешанных эффектов (ANOVA) был подобран для значений log₁₀ рассчитанных концентраций ИФН α . Значения ИФН α выстраивали (по шкале log₁₀) в зависимости от дня забора крови для каждого животного в каждой группе введения. Вертикальные линии

обозначают дни забора крови, сгруппированные по принципу перед введением, после введения дозы до дня 31, и после введения дозы позднее дня 31. Забор крови в срок позднее дня 31 в данном анализе не производился. Оценки на основе модели геометрических средних значений ИФН α обозначены толстыми черными горизонтальными линиями в области каждой диаграммы, относящейся к показателям перед введением дозы и после введения. Расчеты диаграмм и статистический анализ проводили с использованием языка R для статистических расчетов.

Фиг.61 представляет собой графическое изображение уменьшенной TLR9-индуцированной продукции ИФН α в анализе *ex vivo* цельной крови обезьян циномолтус после подкожного введения ВІІВ059. Цельную кровь от обезьян циномолтус, получивших однократную подкожную дозу 0,2 мг/кг ВІІВ05910, разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали СРG-A (2216) до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 19-20 часов. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифуговали для получения сыворотки. Клетки А549 стимулировали собранной сывороткой в течение 19-20 часов при 37°C и 5% CO₂, чтобы индуцировать белок МхА. Через 20 часов клетки А549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка МхА. Выполняли обратный расчет уровней ИФН α (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток А549 возрастающими дозами rИФН α . Двусторонний дисперсионный анализ смешанных эффектов (ANOVA) был подобран для значений log₁₀ рассчитанных концентраций ИФН α . Значения ИФН α выстраивали (по log₁₀) в зависимости от дня забора крови для каждого животного в каждой группе введения. Вертикальные линии обозначают дни забора крови, сгруппированные по принципу перед введением, после введения дозы до дня 33, и после введения дозы позднее дня 33. Забор крови в срок позднее дня 33 в данном анализе не производился. Оценки на основе модели геометрических средних значений ИФН α обозначены толстыми

черными горизонтальными линиями в области каждой диаграммы, относящейся к показателям перед введением дозы и после введения. Расчеты диаграмм и статистический анализ проводили с использованием языка R для статистических расчетов.

Подробное описание

ВІІВ059 является репрезентативным моноклональным антителом, которое специфично связывается с BDCA2 человека. Антитела против BDCA2 по изобретению ингибируют продукцию pDC и/или секрецию цитокинов и хемокинов. Кроме того, антитела против BDCA2 по изобретению могут понижать регулировать уровни CD32a и/или CD62L на поверхности клеток pDC. Также антитела против BDCA2 по изобретению могут опосредовать интернализацию BDCA2 с поверхности клеток pDC. Дополнительно антитела против BDCA2 по изобретению можно использовать для истощения клеток pDC посредством ADCC или CDC, и их можно применять для лечения или профилактики иммунологических заболеваний, таких как воспалительные и аутоиммунные состояния. В настоящем изобретении также показано, что комбинация противомаларийного агента и антитела против BDCA2 по изобретению может дать улучшенные эффекты по сравнению с лечением каждым препаратом в отдельности.

BDCA2

BDCA2 представляет собой лектин C-типа II типа, который специфично экспрессируется на клетках pDC. BDCA2 состоит из единственного внеклеточного домена распознавания углеводов (CRD) на его C-конце, трансмембранной области и короткого цитоплазматического хвоста на его N-конце, который не содержит сигнальный мотив. BDCA2 передает внутриклеточные сигналы посредством ассоциированного трансмембранного адаптора FcεRIγ (фиг.1). Антитело-опосредованное лигирование BDCA2 приводит к рекрутингу селезеночной тирозинкиназы (SYK) в активирующий мотив на основе фосфорилированного иммунорецепторного тирозина (ITAM) в FcεRIγ. Активация Syk приводит к активации В-клеточного линкера (Blk), тирозинкиназы Брутона (BTK) и фосфолипазы Cγ2 (PLCγ2), что приводит к мобилизации Ca²⁺.

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

```

1  MVEEEEPQDR EKGLWWFQLK VWSMAVVSIL LLSVCFTVSS VVPHNFMYSK
51 TVKRLSKLRE YQQYNPSLTC VMEGKDIEDW SCCPTPWTSF QSSCYFISTG
101 MQSWTKSQKN CSVMGADLVV INTREEQDFI IQNLKRNSSY FLGLSDPGGR
151 RHWQWVDQTP YNENVTFWHS GEPNNLDERC AIINFRSSEE GWWNDIHCHV
201 PQKSICKMKK IYI* (SEQ ID NO:1)

```

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

```

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

```

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

Белки BDCA2 человека, обезьян циномолгус и резус могут быть использованы в качестве иммуногенов для получения антител против BDCA2. Для создания человеческих антител против BDCA2 можно использовать человеческий белок BDCA2 в качестве иммуногена. Затем анти-человеческие BDCA2 антитела можно подвергать скринингу для выявления антител, имеющих один или несколько признаков, описанных в настоящем изобретении (например, уменьшение продукции/секреции одного или нескольких интерферонов типа I или типа III, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5 и IP10/CXCL10; истощение клеток pDC; конкурирование с BIIIB059 за связывание с внеклеточным доменом BDCA2; селективное связывание с эктодоменом BDCA2 человека, обезьян циномолгус и резус, но при этом отсутствие связывания с Clec4b2 крысы; ингибирование развития заболевания в модели псориатического ксенотрансплантата у человека).

Антитела против BDCA2

Настоящее изобретение включает последовательности моноклонального антитела BIIB059, которое связывается с BDCA2 человека, обезьян циномолгус и резус, но не связывается с Clec4b2 крысы. BIIB059 не связывается или показывает незначительное связывание с BDCA2 от филогенетических видов нижеуказанных приматов.

BIIB059

BIIB059 представляет собой гуманизированное IgG1 антитело, которое специфично распознает BDCA2 на поверхности плазмитоидных дендритных клеток. Оно было получено из мышинового антитела (24F4), которое связывается с BDCA2 следующим образом. Плазмиду, кодирующую полноразмерный человеческий BDCA2, вводили мышам с помощью генной пушки. Спленоциты из этой мыши были слиты с клетками миеломы, и полученная гибридома продуцировала антитела 24F4. С помощью генноинженерных технологий вставляли антитела 24F4 в каркас человеческого IgG1 дикого типа для поддержания полной эффекторной функции. Предсказанные аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей зрелого BIIB059 представлены ниже.

Области, определяющие комплементарность (CDR) 1, 2, и 3 переменной легкой цепи (VL) и переменной тяжелой цепи (VH), приведены в порядке от N-концу к C-концу зрелых последовательностей VL и VH, и обе из них подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Ниже приведены последовательности зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO:4) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO:3), составляющие антитело, которое называется BIIB059.

Легкая цепь (LC) зрелого BIIB059

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT TCKKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAAASTLES
 GVPSRFGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQANEDPR TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Тяжелая цепь (HC) зрелого BIIB059

DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS TYTMSWVRQA PGKGLEWVAT ISPGDSFGYY
YPDSVQGRFT ISRDNANKSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD IYYNYGAWFA YWGQGTLLTV

SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPFCPAPELL
GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:4)

Вариабельная легкая цепь (VL) BII059 имеет следующую аминокислотную последовательность:

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

Вариабельная тяжелая цепь (VH) BII059 имеет следующую аминокислотную последовательность:

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

Аминокислотные последовательности областей CDR VL в BII059 перечислены ниже:

VL CDR1: KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5);

VL CDR2: AASTLES (SEQ ID NO:6); и

VL CDR3: QQANEDPRT (SEQ ID NO:7).

Аминокислотные последовательности областей CDR VH в BII059 перечислены ниже:

VH CDR1: TYTMS (SEQ ID NO:8) (CDR1 по Kabat) или

GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9) (расширенная по Chothia/AbM CDR1);

VH CDR2: TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10);

VH CDR3: DIYY YGAWFAY (SEQ ID NO:11).

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

Антитела против BDCA2 по изобретению также могут содержать в BII059 "альтернативные области CDR". "Альтернативными" CDR

считаются CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), которые определены в соответствии с любой одной из систем Chothia, AbYsis, расширенной Chothia/AbM CDR или контактных определений. Эти альтернативные CDR могут быть получены, например, с помощью базы данных AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi). Аминокислотные последовательности из "альтернативных" областей CDR 1, 2 и 3 из вариабельного участка тяжелой цепи и вариабельного участка легкой цепи BIIB059 сравниваются с областями CDR, определенными в соответствии с нумерацией по Kabat в таблице ниже.

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

VL CDR3	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPR (SEQ ID NO:97)
------------	----------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Антитела против BDCA2 могут включать CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи в соответствии с определением по Kabat, определением по Chothia от Abysis, расширенным определением по Chothia/AbM CDR или контактным определением. Эти антитела могут иметь, например, 1, 2 или 3 замены в пределах одной или нескольких (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) областей CDR. Эти антитела обладают следующими свойствами: (i) связываются с BDCA2 человека или обезьян циномолгус, но не показывают значительного связывания с BDCA2 от филогенетических видов нижеуказанных приматов; и/или (ii) ингибируют продукцию TLR7/TLR9-индуцированного интерферона I типа и продукцию других цитокинов или хемокинов посредством человеческих pDC; и/или (iii) опосредуют интернализацию BDCA2 с поверхности клеток pDC; и/или (iv) подавляют CD32a и/или CD62L на поверхности pDC; и/или (v) истощают клетки pDC in vitro посредством ADCC или CDC.

Антитела IgG человека представляют собой тетрамерные молекулы, содержащие две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь B1B059 ковалентно связана с тяжелой цепью посредством межцепочечной дисульфидной связи (LC Cys 218 - HC Cys 225), и тяжелые цепи спарены друг с другом с помощью двух межцепочечных дисульфидов (HC Cys 231-Cys 231 и Cys 234-Cys 234). Все остальные цистеины образуют внутримолекулярные дисульфиды, которые стабилизируют константные и переменные домены.

В некоторых вариантах осуществления антитела против BDCA2 включают константную область тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, то такие замены модифицируют свойства антитела

(например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором, гликозилирование антитела, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG антитело. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с аффинностью от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRII (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. В таблице 1 приведен перечень свойств антитела BIIIB059.

ТАБЛИЦА 1

Молекулярная масса (рассчитанная/фактическая дегликозилированная)	146348,2 Да/146352 Да
Молекулярная масса (дегликозилированная тяжелая цепь, предполагаемая/фактическая)	49425,8 Да/49424 Да
Молекулярная масса (легкая цепь, предполагаемая/ фактическая)	23764,3 Да/23765 Да
Молекулярная масса (SDS-PAGE)	150000 Да
Коэффициент экстинкции (1 мг/мл)	1,46 мл/мг/см при 280 нм
Максимальная абсорбция	275 нм
pI (рассчитанная)	7,26

pI (изоэлектрическое фокусирование IEF)	Основной компонент 7,01 Минорные компоненты 6,90, 6,81, 6,78, 7,09
EC ₅₀ BDCA2 человека (FACS)	7 нМ
EC ₅₀ BDCA2 циномоглус (FACS)	7 нМ
Модуляция температуры в дифференциальной сканирующей калориметрии (T _m - DSC)	CH2: 72°C Fab: 68,6°C, 75,9°C CH3: 85°C
Свободный SH	0,4/моль (1,1%)
Гликация	0,1 моль/моль ВІІВ059
N-связанное гликозилирование RRS1	G0 (69%) G1 (23,9%) G2 (2,2%) А-гликозилированные (1%)
Образец буфера для композиции	20 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, pH 6,0
Растворимость в буфере композиции	>150 мг/мл
Агрегация (SEC)	0,2%
Агрегация (AUC)	0,3% (в основном димеры)
T _{1/2}	7,3 дня у крыс
Эндотоксин	0,05 EU/мг белка

ВІІВ059 проявляет подходящие физико-химические свойства для терапевтического антитела. Это антитело показывает низкие уровни агрегации. Каркас IgG1 дикого типа содержит в молекуле один N-связанный сайт гликозилирования и ВІІВ059, и связывается с Fc-рецепторами с аффинностью, которая типична для этого класса молекул. Расчетный индекс pI 7,26 является несколько низким для антитела. Исходя из гетерогенности заряда, выявленной у ВІІВ059, предполагается, что значительная часть ВІІВ059 содержит модификации. Такая гетерогенность заряда обусловлена, по меньшей мере частично, уровнем гликации

примерно до 10%, который был определен в очищенных партиях ВІІВ059. Показатель сворачивания T_m для ВІІВ059 находится на нижнем конце типичных значений, наблюдаемых у антител, тогда как эти показатели для доменов CH2 и CH3 характерны для полностью гликозилированного мАт IgG1. На основании дифференциальной сканирующей флуориметрии и измерений вязкости можно создавать рецептуру ВІІВ059, например, с концентрацией 50 мг/мл, в 20 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, с уровнем pH 6,0. Это антитело может быть также приготовлено в более высоких концентрациях, например, от 150 до 300 мг/мл (например, 150, 200, 250, 300 мг/мл).

ВІІВ059 является полностью гуманизированным, Fc-функционально компетентным мАт IgG1, которое демонстрирует высокую аффинность к BDCA2 и связывается одинаково хорошо с нативным BDCA2 человека и BDCA2 обезьян циномолгус. ВІІВ059 является мощным ингибитором всех TLR9-индуцированных интерферонов I типа, а также других цитокинов и хемокинов посредством клеток pDC. У здоровых доноров и больных СКВ антитело ВІІВ059 проявляет одинаковый потенциал ингибирования TLR9-индуцированного интерферона I типа посредством клеток pDC. ВІІВ059 посредством pDC специфично ингибирует TLR9-индуцированный ИФН типа I и не влияет на продукцию ИФН посредством других типов клеток, которая запускается другим TLR лигандом. ВІІВ059 вызывает быструю интернализацию BDCA2 с клеточной поверхности. При стимуляции BDCA2 колокализуются с TLR9 в эндосомальном/лизосомальном компартменте, который представляется необходимым для ингибирования сигнального пути TLR9. Было установлено, что ВІІВ059 вызывает шеддинг CD62L с поверхности человеческих pDC, что может повлиять на их возвращение в органы-мишени (хоуминг). В исследованиях *in vitro* антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) было показано, что ВІІВ059 может проявлять действие истощения клеток в клеточных линиях с гиперэкспрессией BDCA2. Однако тот факт, что ВІІВ059 вызывает быструю и полную интернализацию BDCA2 с поверхности клеток pDC, снижает вероятность эффекта ВІІВ059 в

виде устойчивого истощения pDC *in vivo*. Комбинация ВІІВ059 и гидроксихлорохина (HCQ) вызывает эффект аддитивного ингибирования TLR7- и TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством РВМС у здоровых доноров. Эти данные подчеркивают потенциальный аддитивный терапевтический эффект при введении ВІІВ059 с противомаларийными соединениями, такими как HCQ.

Антитела, такие как ВІІВ059, можно создавать, например, путем подготовки и экспрессии синтетических генов, которые кодируют перечисленные аминокислотные последовательности, или путем мутации генов зародышевой линии человека, чтобы получить ген, который кодирует перечисленные аминокислотные последовательности. Кроме того, это антитело и другие антитела против BDCA2 могут быть получены, например, с использованием одного или нескольких из указанных ниже способов.

Способы получения антител против BDCA2

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

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

В одном из вариантов осуществления животное, не являющееся человеком, включает по меньшей мере часть гена иммуноглобулина

человека. Например, можно создать линию мышей с дефицитом продукции антитела мыши с большими фрагментами локусов человеческого Ig. С помощью технологии гибридомы можно получать и проводить селекцию антиген-специфичных моноклональных антител, полученных из генов с желаемой специфичностью. Смотрите, например, публикации XENOMOUSE™, Green et al. *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994), патенты US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело получают из животного нечеловеческого происхождения, после чего его модифицируют, например, проводят гуманизацию или деиммунизацию. В патенте US 5225539 автор Winter описывает в качестве примера способ трансплантации CDR, который может быть использован для получения гуманизированных антител по изобретению. Все или некоторые из областей CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере частью из не-человеческого антитела. Для получения эффективного гуманизированного антитела, которое связывается с BDCA2, может потребоваться только замена областей CDR, необходимых для связывания, или замена связывающих детерминант таких CDR.

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

синтетических конструкций. Затем можно клонировать рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, в соответствующий вектор экспрессии.

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

BDCA2-связывающие антитела нечеловеческого происхождения также могут быть модифицированы путем специфичной делеции эпитопов человеческих Т-клеток или способами "деиммунизации", описанными в патентах WO 98/52976 и WO 00/34317. Коротко, можно проводить анализ переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела на пептиды, которые связываются с главным комплексом гистосовместимости (МНС) класса II; эти пептиды представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных Т-клеточных эпитопов можно применять подход компьютерного моделирования, называемый "протягивание пептида", и, дополнительно, можно проводить поиск в базе человеческих пептидов, связывающихся с МНС класса II, для выявления мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, как описано в патентах WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с каким-либо из 18 основных DR аллотипов МНС класса II и таким образом представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы. Обнаруженные потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть удалены путем замены небольшого числа аминокислотных остатков в переменных областях или предпочтительно путем единичных

аминокислотных замен. Насколько это возможно, выполняют консервативные замены. Часто, но не исключительно, можно использовать аминокислоты, обычные для положений в человеческой последовательности зародышевой линии антитела. После идентификации деиммунизирующих изменений можно конструировать нуклеиновые кислоты, кодирующие VH и VL, с помощью мутагенеза или другими способами синтеза (например, путем синтеза *de novo*, замены кассеты и т.д.). Мутагенезированная переменная последовательность может быть слита, если это желательно, с человеческой константной областью, например, с константными областями человеческого IgG1 или каппа.

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

связывания различных вариантов в комбинации со степенью деиммунизации, в частности, с количеством потенциальных Т-клеточных эпитопов, оставшихся в вариабельной области. Деиммунизация может быть использована для модификации любого антитела, например, антитела, которое включает последовательность человеческого происхождения, например, синтетического антитела, мышинового антитела, отличного от нечеловеческого моноклонального антитела, или антитела, выделенного из библиотеки дисплеев.

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

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

в шарнирной области IgG4, как описано в области, к которой относится настоящее изобретение (например, Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30: 105-08). Смотрите также, например, US 2005-0037000.

Созревание аффинности

В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент подвергается модификации, например, путем мутагенеза, для получения пула модифицированных антител. Затем проводят оценку модифицированных антител для выявления одного или нескольких антител, имеющих измененные функциональные свойства (например, улучшенное связывание, улучшенную стабильность, сниженную антигенность или повышенную стабильность *in vivo*). В одном из вариантов осуществления используется технология библиотек дисплеев для выбора или скрининга пула модифицированных антител. Затем определяют антитела с более высокой аффинностью из второй библиотеки, например, с помощью условий с большей степенью строгости или условий с более высокой конкурентностью связывания и условий промывания. Также можно использовать другие способы скрининга.

В некоторых вариантах осуществления мутагенез направлен на участки, в отношении которых известно или предполагается, что они расположены на связывающей поверхности. Например, если идентифицированные связывающие белки являются антителами, то мишенями мутагенеза могут быть области CDR из тяжелой или легкой цепи, как описано в изобретении. Дополнительно, мишенями мутагенеза могут быть каркасные области, примыкающие или расположенные вблизи от областей CDR, например, каркасные области, в частности, в пределах 10, 5 или 3 аминокислот в CDR сочленении. В случае антител, мутагенез также может быть ограничен одной или несколькими областями CDR, например, для осуществления этапных улучшений.

В одном из вариантов осуществления применяют мутагенез, чтобы достичь более высокого сходства антител с одной или несколькими последовательностями зародышевой линии. Один способ зародышевых линий, в качестве примера, может включать: определение одной или нескольких последовательностей

зародышевой линии, которые имеют сходство (например, максимальное сходство в конкретной базе данных) с последовательностью выделенного антитела. Затем можно осуществлять мутации (на уровне аминокислот) в выделенном антителе, или постепенно, в комбинации, или обоими способами. Например, создают библиотеку нуклеиновых кислот, которая включает последовательности, кодирующие некоторые или все возможные мутации зародышевой линии. Затем проводят оценку мутированных антител, например, для идентификации антитела, которое имеет один или несколько дополнительных остатков зародышевой линии, по сравнению с выделенным антителом, и при этом сохраняет свою эффективность (например, обладает функциональной активностью). В одном из вариантов осуществления в выделенное антитело вводят настолько много остатков зародышевой линии, насколько это возможно.

В одном из вариантов осуществления используют мутагенез для замены или вставки одного или нескольких остатков зародышевой линии в область CDR. Например, остаток CDR зародышевой линии может происходить от последовательности зародышевой линии, которая имеет сходство (например, максимальное сходство) с варибельной областью, которая подвергается модификации. После мутагенеза можно оценивать активность (например, связывание или другую функциональную активность) антитела, чтобы определить толерантность к остатку или остаткам зародышевой линии. Подобный мутагенез можно осуществлять в каркасных областях.

Селекцию последовательности зародышевой линии можно выполнять разными путями. Например, можно выбирать последовательность зародышевой линии, если она удовлетворяет определенным критериям селективности или подобия, например, имеет по меньшей мере определенный процент идентичности, например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентичности, по сравнению с донорским не-человеческим антителом. Селекцию можно выполнять с использованием по меньшей мере 2, 3, 5 или 10 последовательностей зародышевой линии. В случае CDR1 и CDR2,

идентификация сходной последовательности зародышевой линии может включать отбор одной такой последовательности. В случае CDR3, идентификация сходной последовательности зародышевой линии может включать отбор одной такой последовательности, но может включать использование двух последовательностей зародышевой линии, которые по отдельности составляют аминоконцевые части и карбоксиконцевые части. В других вариантах осуществления используются больше одной или двух последовательностей зародышевой линии, например, для создания консенсусной последовательности.

Расчет "идентичности последовательности" между двумя последовательностями выполняют следующим образом. Последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, можно вводить пробелы в одну или в обе первую и вторую последовательность аминокислот или нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания, и для целей сравнения можно пренебречь негомологичными последовательностями). Оптимальное выравнивание определяется как лучший результат подсчета с помощью программы GAP в пакете программ GCG с матрицей счета Blossum62 со штрафом за пропуск 12, штрафом за длину пропуска 4, и штрафом за пробел сдвига рамки считывания 5. Затем сравниваются аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то в этом положении молекулы являются идентичными. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию от числа идентичных положений, общих для этих последовательностей.

В других вариантах осуществления изобретения антитело может быть модифицировано для получения измененных характеристик гликозилирования (т.е. измененных по сравнению с исходным или нитивным характером гликозилирования). Используемое в настоящем контексте понятие "изменение" означает наличие делеции одного или нескольких углеводных остатков и/или наличие добавления одного или нескольких сайтов

гликозилирования в исходное антитело. Добавление сайтов гликозилирования в антитела по изобретению, можно осуществлять путем такого изменения последовательности аминокислот, чтобы они содержали сайт гликозилирования консенсусных последовательностей; такие способы хорошо известны в настоящей области техники. Другой способ увеличения числа углеводных остатков на антителах заключается в химическом или ферментативном связывании гликозидов с аминокислотными остатками антитела. Эти способы описаны, например, в патенте WO 87/05330 и публикации Aplin and Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem*, 22: 259-306. Удаление любых углеводных остатков, присутствующих на антителах, может быть осуществлено химическим или ферментативным путем, как описано в данной области техники (Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52; Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.*, 118: 131; и Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol*, 138:350). Смотрите, например, патент США № 5869046 в отношении модификации, которая увеличивает период полувыведения *in vivo* с помощью связывающего эпитопа рецептора реутилизации.

В одном из вариантов осуществления антитело имеет последовательности CDR (например, CDR по системе Chothia или Kabat), которые отличаются от последовательностей моноклональных антител ВІІВ059. Последовательности CDR, которые отличаются от последовательностей моноклонального антитела ВІІВ059, включают аминокислотные замены, например, замены 1, 2, 3 или 4 аминокислот, если CDR имеет 5-7 аминокислот в длину, или замены 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот в последовательности CDR, если CDR имеет 10 или больше аминокислот в длину. Замещающая аминокислота может иметь аналогичный заряд, гидрофобность или стереохимические характеристики. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена (замены) является консервативной заменой. В других вариантах осуществления аминокислотная замена (замены) не является консервативной заменой. Осуществление таких замен хорошо известно среднему специалисту в данной области. Антитела или фрагменты антител, которые содержат замещенные области CDR,

можно подвергать скринингу на выявление антител, имеющих одну или несколько функций, описанных в настоящем документе (например, снижение продукции/секреции интерферонов I типа или III типа, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, CCL5/RANTES или IP10/CXCL10; истощение клеток pDC; конкуренция за связывание внеклеточного домена BDCA2 с BIIIB059; селективное связывание с эктодоменом BDCA2 человека, обезьян циномолгус и резус, и отсутствие связывания с Clec4b2 крысы или связывание с Clec4b2 крысы с более низкой аффинностью, чем с BDCA2 человека, обезьян циномолгус или резус; торможение развития заболевания на модели псориатического ксенотрансплантата человека).

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

Антитела против BDCA2 могут быть в виде полноразмерных антител или в виде низкомолекулярных форм антител против BDCA2 (например, в виде биологически активных фрагментов антител или минител), таких как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, scFv и sc(Fv)₂. Другие анти-антитела BDCA2, рассматриваемые настоящим изобретением, представляют собой однодоменные антитела (sdAb), содержащие одну переменную цепь, такую как VH или VL, или ее биологически активный фрагмент. Смотрите, например, Moller et al, J. Biol. Chem., 285(49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 77(1): 13-22 (2007); патент US 2005/0079574 и публикацию Davies et al. (1996) Protein Eng.,

9(6):531-7. Как и целое антитело, sdAb способно селективно связываться со специфичным антигеном. Имея молекулярную массу только от 12 до 15 кДа, sdAb имеют намного меньший размер, чем обычные антитела, и даже меньше, чем Fab-фрагменты и одноцепочечные переменные фрагменты.

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

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

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

Термин "смесь", используемый в изобретении по отношению к композиции, содержащей антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, означает присутствие как желаемого

антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента, так и одного или нескольких его кислотных вариантов. Кислотные варианты могут содержать преимущественно деамидированное антитело против BDCA2, с незначительными количествами другого кислотного варианта (вариантов).

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

В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, или его низкомолекулярные антитела связываются с BDCA2 на клетках pDC, и посредством pDC ингибируют или уменьшают продукцию и/или секрецию интерферонов I типа или III типа, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, CCL5/RANTES или IP10/CXCL10; и/или истощают клетки pDC посредством ADCC или CDC или апоптоза; и/или уменьшают степень тяжести симптомов при введении пациентам-людям или животным моделям, у которых имеется одно или несколько из следующих заболеваний: системная красная волчанка, кожная волчанка, дискоидная волчанка, волчаночный нефрит, склеродермия, кольцевидная склеродерма, ревматоидный артрит, полимиозит-дерматомиозит, псориаз, синдром Шегрена, васкулит и сахарный диабет типа I. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, или его низкомолекулярные антитела тормозят развитие болезни в модели псориатического ксенотрансплантата у человека (Nestle et al., J. Exp. Med., 202 (1): 135-143. (2005)). Эти свойства антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента, или его низкомолекулярных антител могут быть измерены в соответствии со способами, описанными в разделе примеров, а также с помощью других способов, известных в данной области техники.

Фрагменты антител

Фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv), могут быть получены путем протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антител могут быть получены путем обработки целого антитела с ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. Папаиновое расщепление целых антител дает фрагменты F(ab)₂ или Fab; пепсиновое расщепление целых антител дает фрагменты F(ab')₂ или Fab'; и плазминовое расщепление целых антител дает фрагменты Fabc.

Кроме того, фрагменты антител можно получать рекомбинантным способом. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты представляющего интерес антитела, могут быть сконструированы, введены в вектор экспрессии и экспрессированы в подходящие клетки-хозяева. Смотрите, например, публикации Co, M.S. et al., J. Immunol, 152:2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. and Skerra, A., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121 :652-663 (1989); Rousseaux, J. et al, Methods in Enzymology, (1989) 121 :663-669 (1989); и Bird, R.E. et al, TIBTECH, 9: 132-137 (1991)). Фрагменты антител можно экспрессировать в E.coli и секретировать из E.coli, таким образом можно легко производить большое количество этих фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из фаговой библиотеки антител. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно выделены из E.coli и химически связаны с образованием фрагментов F(ab)₂ (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с увеличенным in vivo периодом полувыведения, содержащие остатки связывающего эпитопа рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046.

Минитела

Минитела антитела против антител против BDCA2 включают диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)₂ (sc(Fv)₂).

"Диатело" представляет собой бивалентное минитело, сконструированное путем слияния генов (смотрите, например, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), EP 404097, WO 93/1 1161). Диантитела являются димерами, состоящими из двух полипептидных цепей. Домены VL и VH каждой полипептидной цепи диатела связаны посредством линкеров. Количество аминокислотных остатков, которые составляют линкер, может быть от 2 до 12 остатков (например, от 3 до 10 остатков, или пять или примерно пять остатков). Линкеры полипептидов в диателе обычно являются слишком короткими, чтобы позволить связывание VL и VH друг с другом. Таким образом, VL и VH, кодируемые в одной и той же полипептидной цепи, не могут сформировать одноцепочечный фрагмент вариабельной области, но вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным фрагментом вариабельной области. В результате диатело имеет два антигенсвязывающих сайта.

ScFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем связывания VH и VL с помощью линкера (смотрите, например, Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988); и Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", том 113, Ed. Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, стр. 269-315 (1994)). Порядок связывания областей VH и VL конкретно не ограничен, и они могут быть расположены в произвольном порядке. Примеры расположения включают: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. Можно получать V область Н-цепи и V область L-цепи ScFv из любого антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

Sc(Fv)₂ представляет собой минитело, в котором две VH и две VL области связаны посредством линкера с образованием одной цепи (Hudson et al., J. Immunol. Methods, (1999) 231: 177-189 (1999)). Можно создавать SC(Fv)₂, например, путем соединения scFvs с линкером. Согласно изобретению, sc(Fv)₂ предпочтительно включают антитела, в которых две VH и две VL области расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца

одноцепочечного полипептида; вместе с тем, порядок двух VH и двух VL не ограничивается описанной выше конструкцией, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры расположения перечислены ниже:

[VL] линкер [VH] линкер [VH] линкер [VL]

[VH] линкер [VL] линкер [VL] линкер [VH]

[VH] линкер [VH] линкер [VL] линкер [VL]

[VL] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VH]

[VL] линкер [VH] линкер [VL] линкер [VH]

Если связывается четыре переменные области антитела, обычно требуется три линкера; используемые линкеры могут быть одинаковыми или разными. Не существует конкретных ограничений в отношении линкеров, которые связываются с VH и VL областями минителя. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. В качестве линкера можно использовать любой произвольный одноцепочечный пептид, содержащий от трех до 25 остатков (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 остатков). Примеры таких пептидных линкеров включают: Ser; Gly Ser; Gly Gly Ser; Ser Gly Gly; Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:13); Ser Gly Gly Gly (SEQ ID NO:14); Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:15); Ser Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO:16); Gly Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:17); Ser Gly Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO:18); Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:19); Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO:20); (Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:21))_n, где n равно целому числу от одного или больше; и

(Ser Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO:22))_n, где n равно целому числу от одного или больше.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкерное синтетическое соединение (химический сшивающий агент). Примеры сшивающих агентов, которые доступны на рынке, включают N-гидроксисукцинимид (NHS), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил) суберат (BS3), дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), этиленгликоль-

бис (сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидил тартрат (сульфо-DST), бис [2- (сукцинимидоокикарбонилокси) этил] сульфон (BSOCOES) и бис [2- (сульфосукцинимидоокикарбонилокси) этил] сульфон (сульфо-BSOCOES).

Аминокислотная последовательность из VH или VL в минителах может включать модификации, такие как замены, делеции, добавления и/или инсерции. Например, модификации могут располагаться в одной или нескольких областях CDR в антител против BDCA2е или его антигенсвязывающем фрагменте (например, ВІІВ059). В некоторых вариантах осуществления модификация включает одну, две или три аминокислотных замены в одной или нескольких областях CDR из домена VH и/или VL анти-BDCA2 минитела. Такие замены делают для улучшения связывания и/или функциональной активности анти-BDCA2 минитела. В других вариантах осуществления можно удалять или добавлять одну, две или три аминокислоты в областях CDR из антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, ВІІВ059), поскольку наличие связывающей и/или функциональной активности BDCA2 связано с ассоциацией VH и VL.

Биспецифичные антитела

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

Общепринятое получение полноразмерных биспецифичных антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелой-легкой цепи иммуноглобулина, при этом эти две цепи обладают разной специфичностью (Millstein et al., Nature, 305: 537-539.

(1983)). В другом подходе переменные домены антитела с желаемой специфичностью связывания сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. ДНК, кодирующие слияния иммуноглобулиновой тяжелой цепи и, если это желательно, иммуноглобулиновой легкой цепи, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и ко-трансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это дает большую гибкость в подборе пропорций трех полипептидных фрагментов. Вместе с тем, можно вставлять кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким результатам.

В соответствии с другим подходом, описанным в патенте США № 5731168, можно создавать поверхность раздела между парой молекул антител, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, которые выделяют из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность раздела содержит по меньшей мере часть домена CH3. В этом способе одну или несколько небольших боковых аминокислотных цепей из поверхности раздела первой молекулы антитела заменяют несколькими крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). На поверхности раздела второй молекулы антитела создаются компенсационные "полости" для большой боковой цепи (цепей) идентичного или сходного размера путем замены крупных боковых аминокислотных цепей на цепи меньшего размера (например, на аланин или треонин). Так создается механизм для увеличения образования гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

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

Технология "диатела" обеспечивает альтернативный механизм получения фрагментов биспецифичных антител. Эти фрагменты содержат VH, соединенный с VL посредством линкера, который

является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными VL и VH доменами другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих участка.

Поливалентные антитела

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

Конъюгированные антитела

Антитела, раскрытые в изобретении, могут представлять собой конъюгированные антитела, которые связаны с различными молекулами, включающими макромолекулярные субстанции, такие как полимеры (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленимин (ПЭИ), модифицированный ПЭГ (ПЭИ-ПЭГ), полиглутаминовая кислота

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

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

В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент модифицируют с фрагментом, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в циркуляторном русле, например, в крови, сыворотке или в других тканях, например, по меньшей мере в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть связаны (например, конъюгированы) с полимером, например, по существу с неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры варьируются в основном в зависимости от веса. Можно использовать полимеры, имеющие среднечисловую молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 35000 Дальтон (или от приблизительно 1000 до приблизительно 15000, и от 2000 до приблизительно 12500 Да). Например, антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с водорастворимым полимером, например, с гидрофильным поливиниловым полимером, например, с поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров

включают гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиоксиэтилированные полиолы, их сополимеры и блок-сополимеры, при условии, что эти блок-сополимеры сохраняют растворимость в воде. Дополнительные эффективные полимеры включают полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, полиметакрилаты, карбомеры и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

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

Способы получения антител

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

Если необходимо экспрессировать антитело в бактериальных клетках (например, *E.coli*), вектор экспрессии должен обладать свойствами, которые позволяют амплифицировать этот вектор в бактериальных клетках. Дополнительно, когда в качестве хозяина

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

Если антитело предназначено для экспрессии в животных клетках, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, то экспрессионный вектор включает промотор, необходимый для экспрессии в этих клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был встроен вектор (смотрите, например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017). Например, обычно ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, для клетки-хозяина, в которую был встроен вектор. Примеры векторов

с селектируемыми маркерами включают pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

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

В примере системы для экспрессии антитела в клетки CHO dhfr⁻ вводят рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий и тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела из антитела против BDCA2 (например, B1B059) с помощью опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В рекомбинантном векторе экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально связан с энхансерными/промоторными регуляторными элементами (например, полученными из SV40, цитомегаловируса, аденовируса и т.п., такими как CMV энхансерный/промоторный регуляторный элемент AdMLP или SV40 энхансерный/промоторный регуляторный элемент AdMLP) для запуска транскрипции генов на высоком уровне. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, позволяющий проводить селекцию клеток CHO, которые были трансфицированы вектором с селекцией/амплификацией с использованием метотрексата. После селекции трансформированные клетки-хозяева культивируют для экспрессии тяжелых и легких цепей антитела, и антитело выделяют из культуральной среды.

Антитела могут быть также получены с помощью трансгенного животного. Например, в патенте США № 5849992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который включает

специфичный к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, полученное от самок таких трансгенных млекопитающих, включает представляющее интерес антитело, которое секретируется в нем. Антитело может быть очищено от молока, или, для некоторых применений, используется непосредственно. Также описаны животные, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот по изобретению.

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

Характеристика антител

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

Связывающее взаимодействие рассматриваемого белка (антитела против BDCA2) и мишени (например, BDCA2) можно проанализировать с помощью систем ОСТЕТ®. В этом способе используется один из нескольких вариантов инструментов (например, ОСТЕТ® QK^e и QK), производимые компанией ForteBio, для определения белковых взаимодействий, специфичности связывания и картирования эпитопов. Системы ОСТЕТ® представляют легкий способ мониторинга связывания в режиме реального времени путем измерения изменений в поляризованном свете, который проходит через специальный наконечник, а затем возвращается к датчику.

Связывающее взаимодействие рассматриваемого белка (антитела против BDCA2) и мишени (например, BDCA2) можно проанализировать с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализ SPR или анализ биомолекулярного взаимодействия (BIA) выявляет биоспецифичные взаимодействия в режиме реального времени, без выделения какого-либо из взаимодействующих элементов. Изменения массы на поверхности связывания (что является индикатором факта связывания) на матрице BIA вызывает изменения показателя преломления света вблизи поверхности (оптическое явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR)). Изменения преломления генерируют детектируемый сигнал, которые измеряют как показатель реакций между биологическими молекулами в реальном времени. Способы с использованием SPR описаны, например, в патенте США № 5641640; в публикациях Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander and

Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345; Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705, и в он-лайн ресурсах, предоставленных BIAcore International AB (Упсала, Швеция). Информацию, полученную в анализе SPR, можно использовать для точного и количественного измерения константы равновесной диссоциации (K_d) и кинетических параметров связывания биомолекулы с мишенью, в том числе K_{on} и K_{off} .

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

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

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

Депонирование

Гибридома, продуцирующая анти-BDCA2 моноклональное антитело, под обозначением мышиная гибридома BDCA2-1P24F4.1.1.1, была депонирована в американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC) в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры 15 января 2013 года, и ей был присвоен номер PTA-13450. Заявители признают свою обязанность по перемещению

депозитов, если депозитарий не в состоянии предоставить образец по запросу по причине состояния депозита, до конца срока действия выданного на него патента. Заявители также признают свою ответственность по уведомлению АТСС в выдаче такого патента, на время которого депозит будет доступен для общественности. До этого времени депозит будет доступен для Уполномоченного по патентам согласно условиям CFR § 37 1.14 и 35 USC § 112.

Антитела с измененной эффекторной функцией

Взаимодействие антител и комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы запускает множество ответов, называемых в изобретении эффекторными функциями. Иммуноопосредованные эффекторные функции включают два основных механизма: антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Оба механизма опосредуются константной областью иммуноглобулинового белка. Таким образом, Fc домен антитела является частью, которая определяет взаимодействие с иммунными эффекторными механизмами.

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

Эффекторную функцию антитела против BDCA2 по настоящему изобретению можно определять с помощью одного из множества

известных анализов. Эффекторная функция антитела против BDCA2 может быть увеличена или снижена по сравнению со вторым антителом против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления вторым антителом против BDCA2 может быть любое антитело, которое специфично связывается с BDCA2. В других вариантах осуществления вторым BDCA2-специфичным антителом может быть любое из антител по изобретению, такое как BIIB059. В других вариантах осуществления, где рассматриваемое антитело против BDCA2 было модифицировано для увеличения или уменьшения эффекторной функции, второе антитело против BDCA2 может представлять собой немодифицированную или исходную версию антитела.

Эффекторные функции включают антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), в результате чего антитела связываются с Fc рецепторами на цитотоксических Т-клетках, клетках-натуральных киллерах (НК), макрофагах, что приводит к гибели клеток, и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), которая вызывает гибель клеток, индуцированную посредством активации каскада комплемента (смотрите публикации Daeron, *Annu. Rev. Immunol*, 15:203-234 (1997); Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunol*, 2:77-94 (1995); и Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-492 (1991)). Для этих эффекторных функций обычно необходимо, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, с переменным доменом антитела) и могла быть оценена с помощью стандартных анализов, которые известны в данной области техники (смотрите, например, патенты WO 05/018572, WO 05/003175 и US 6242195).

Можно избежать эффекторных функций путем использования фрагментов антител, лишенных Fc-домена, таких как Fab, Fab'₂ или одноцепочечного Fv. В качестве альтернативы, можно использовать антитело подтипа IgG4, которое связывается с FcγRI, но плохо связывается с C1q и FcγRII и RIII. Подтип IgG2 также проявляет уменьшенное связывание с Fc рецепторами, но сохраняет значительное связывание с аллотипом H131 из FcγRIIa и

Clq. Таким образом, требуются дополнительные изменения в последовательности Fc для устранения связывания со всеми Fc рецепторами и с Clq.

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

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

Сайт связывания с FcγR на антителах человека и мыши уже был картирован на так называемой "нижней шарнирной области", состоящей из остатков 233-239 (нумерация по индексу EU в соответствии со следующими публикациями: Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Woof et al, Molec. Immunol. 23:319-330 (1986); Duncan et al, Nature 332:563 (1988); Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173: 1483-1491 (1991); Chappel et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040 (1991)). Среди остатков 233-239, остатки P238 и S239 входят в число тех, которые, возможно, являются вовлеченным в связывание. Другие ранее указанные области, возможно, участвующие в связывании с FcγR, представляют собой:

G316-K338 (IgG человека) с человеческим FcγRI (Woof et al, Mol. Immunol, 23:319-330 (1986)); K274-R301 (IgG1 человека) с человеческим FcγRIII (Sarmay et al. Molec. Immunol. 21:43-51 (1984)), и Y407-R416 (IgG человека) с человеческим FcγRIII (Gergely et al., Biochem. Soc. Trans. 12:739-743 (1984) и Shields et al, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001), Lazar G.A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 4005-4010 (2006). Эти и другие участки или области аминокислотных остатков, участвующих в связывании с FcR, могут быть очевидными для специалиста после изучения кристаллических структур комплексов Ig-FcR (смотрите, например, Sondermann et al. 2000 Nature 406(6793): 267-73, и Sondermann et al. 2002 Biochem. Soc. Trans. 30 (4): 481-6). Соответственно, антитела против BDCA2 по настоящему изобретению включают модификации одного или нескольких из вышеуказанных остатков (для увеличения или уменьшения эффекторной функции, когда это необходимо).

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

Способы повышения эффекторной функции антител хорошо известны в данной области техники (смотрите, например, Kelley et al, Methods Mol. Biol, 901: 277-93 (2012); Natsume et al, Drug Des. Devel. Ther., 3:7-16 (2009), US 8188231, US 7960512). В одном из вариантов осуществления BDCA2 антитела имеют одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или больше аминокислотных замен в положениях, которые выбирают из группы, состоящей из 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320,

322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336 и 337, где нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитела BDCA2 имеют одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или больше аминокислотных замен, выбираемых из группы, состоящей из: D221K, D221Y, K222E, K222Y, T223E, T223K, H224E, H224Y, T225E, T225K, T225W, P227E, P227G, P227K, P227Y, P228E, P228G, P228K, P228Y, P230A, P230E, P230G, P230Y, A231E, A231G, A231K, A231P, A231Y, P232E, P232G, P232K, P232Y, E233A, E233D, E233F, E233G, E233H, E233I, E233K, E233L, E233M, E233N, E233Q, E233R, E233S, E233T, E233V, E233W, E233Y, L234A, L234D, L234E, L234F, L234G, L234H, L234I, L234K, L234M, L234N, L234P, L234Q, L234R, L234S, L234T, L234V, L234W, L234Y, L235A, L235D, L235E, L235F, L235G, L235H, L235I, L235K, L235M, L235N, L235P, L235Q, L235R, L235S, L235T, L235V, L235W, L235Y, G236A, G236D, G236E, G236F, G236H, G236I, G236K, G236L, G236M, G236N, G236P, G236Q, G236R, G236S, G236T, G236V, G236W, G236Y, G237D, G237E, G237F, G237H, G237I, G237K, G237L, G237M, G237N, G237P, G237Q, G237R, G237S, G237T, G237V, G237W, G237Y, P238D, P238E, P238F, P238G, P238H, P238I, P238K, P238L, P238M, P238N, P238Q, P238R, P238S, P238T, P238V, P238W, P238Y, S239D, S239E, S239F, S239G, S239H, S239I, S239K, S239L, S239M, S239N, S239P, S239Q, S239R, S239T, S239V, S239W, S239Y, V240A, V240I, V240M, V240T, F241D, F241E, F241L, F241R, F241S, F241W, F241Y, F243E, F243H, F243L, F243Q, F243R, F243W, F243Y, P244H, P245A, K246D, K246E, K246H, K246Y, P247G, P247V, D249H, D249Q, D249Y, R255E, R255Y, E258H, E258S, E258Y, T260D, T260E, T260H, T260Y, V262A, V262E, V262F, V262I, V262T, V263A, V263I, V263M, V263T, V264A, V264D, V264E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264K, V264L, V264M, V264N, V264P, V264Q, V264R, V264S, V264T, V264W, V264Y, D265F, D265G, D265H, D265I, D265K, D265L, D265M, D265N, D265P, D265Q, D265R, D265S, D265T, D265V, D265W, D265Y, V266A, V266I, V266M, V266T, S267D, S267E, S267F, S267H, S267I, S267K, S267L, S267M, S267N, S267P, S267Q, S267R, S267T, S267V, S267W, S267Y, H268D, H268E, H268F, H268G, H268I, H268K, H268L, H268M, H268P, H268Q, H268R, H268T, H268V, H268W, E269F, E269G, E269H, E269I, E269K, E269L,

E269M, E269N, E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y,
 D270F, D270G, D270H, D270I, D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R,
 D270S, D270T, D270W, D270Y, P271A, P271D, P271E, P271F, P271G,
 P271H, P271I, P271K, P271L, P271M, P271N, P271Q, P271R, P271S,
 P271T, P271V, P271W, P271Y, E272D, E272F, E272G, E272H, E272I,
 E272K, E272L, E272M, E272P, E272R, E272S, E272T, E272V, E272W,
 E272Y, V273I, K274D, K274E, K274F, K274G, K274H, K274I, K274L,
 K274M, K274N, K274P, K274R, K274T, K274V, K274W, K274Y, F275L,
 F275W, N276D, N276E, N276F, N276G, N276H, N276I, N276L, N276M,
 N276P, N276R, N276S, N276T, N276V, N276W, N276Y, Y278D, Y278E,
 Y278G, Y278H, Y278I, Y278K, Y278L, Y278M, Y278N, Y278P, Y278Q,
 Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W, D280G, D280K, D280L, D280P,
 D280W, G281D, G281E, G281K, G281N, G281P, G281Q, G281Y, V282E,
 V282G, V282K, V282P, V282Y, E283G, E283H, E283K, E283L, E283P,
 E283R, E283Y, V284D, V284E, V284L, V284N, V284Q, V284T, V284Y,
 H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W, H285Y, N286E, N286G, N286P,
 N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H, K290L, K290N, K290W,
 P291D, P291E, P291G, P291H, P291I, P291Q, P291T, R292D, R292E,
 R292T, R292Y, E293F, E293G, E293H, E293I, E293L, E293M, E293N,
 E293P, E293R, E293S, E293T, E293V, E293W, E293Y, E294F, E294G,
 E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S, E294T,
 E294V, E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I,
 Q295M, Q295N, Q295P, Q295R, Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y,
 Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296H, Y296I, Y296K, Y296L, Y296M,
 Y296N, Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297E, N297F,
 N297G, N297H, N297I, N297K, N297L, N297M, N297P, N297Q, N297R,
 N297S, N297T, N297V, N297W, N297Y, S298D, S298E, S298F, S298H,
 S298I, S298K, S298M, S298N, S298Q, S298R, S298T, S298W, S298Y,
 T299A, T299D, T299E, T299F, T299G, T299H, T299I, T299K, T299L,
 T299M, T299N, T299P, T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, T299Y,
 Y300A, Y300D, Y300E, Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P,
 Y300Q, Y300R, Y300S, Y300T, Y300V, Y300W, R301D, R301E, R301H,
 R301Y, V302I, V303D, V303E, V303Y, S304D, S304H, S304L, S304N,
 S304T, V305E, V305T, V305Y, W313F, K317E, K317Q, E318H, E318L,
 E318Q, E318R, E318Y, K320D, K320F, K320G, K320H, K320I, K320L,
 K320N, K320P, K320S, K320T, K320V, K320W, K320Y, K322D, K322F,

K322G, K322H, K322I, K322P, K322S, K322T, K322V, K322W, K322Y, V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324L, S324M, S324P, S324R, S324T, S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D, N325E, N325F, N325G, N325H, N325I, N325K, N325L, N325M, N325P, N325Q, N325R, N325S, N325T, N325V, N325W, N325Y, K326I, K326L, K326P, K326T, A327D, A327E, A327F, A327H, A327I, A327K, A327L, A327M, A327N, A327P, A327R, A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A, L328D, L328E, L328F, L328G, L328H, L328I, L328K, L328M, L328N, L328P, L328Q, L328R, L328S, L328T, L328V, L328W, L328Y, P329D, P329E, P329F, P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S, P329T, P329V, P329W, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L, A330M, A330N, A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y, P331D, P331F, P331H, P331I, P331L, P331M, P331Q, P331R, P331T, P331V, P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332F, I332H, I332K, I332L, I332M, I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F, E333H, E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334L, K334P, K334T, T335D, T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N, T335P, T335R, T335S, T335V, T335W, T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E, S337H и S337N, где нумерация остатков в Fc Fc-области соответствует индексу EU по Kabat. В конкретном варианте осуществления BDCA2 антитела содержат одну, две или три из следующих мутаций: S239D, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S239D/I332E/G236A, S298A, A330L I332E, E333A и K334A.

Наличие олигосахаридов, конкретно, N-связанного олигосахарида на аспарагине-297 в области CH2 IgG1, является важным для связывания с FcγR, а также с C1q. Уменьшение содержания фукозы в антителах улучшает эффекторную функцию (смотрите, например, US 8163551). В некоторых вариантах осуществления BDCA2 антитела имеют сниженное фукозилирование и аминокислотные замены, которые повышают эффекторную функцию (например, одну, две или три из следующих мутаций: S298A, E333A и K334A). Эффекторная функция также может быть достигнута путем получения и экспрессии антител против BDCA2 по изобретению, в присутствии ингибиторов альфа-маннозидазы I (например,

кифунензина) в концентрации ингибитора приблизительно от 60 до 200 нг/мл (например, 60, 75, 100, 150 нг/мл). Антитела, экспрессируемые в присутствии ингибиторов альфа-маннозидазы I, содержат в основном гликаны олигоманнозного типа и обычно демонстрируют повышенную активность ADCC и аффинность к FcγRIIIA, но при этом уменьшенное связывание с C1q.

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

Для снижения эффекторной функции можно использовать комбинации сегментов различных подтипов последовательностей (например, комбинации IgG2 и IgG4), чтобы достичь большего снижения связывания с рецепторами Fcγ, чем каждый из этих подтипов по отдельности (Armour et al. Eur. J. Immunol, 29: 2613-1624 (1999); Mol. Immunol, 40: 585-593 (2003)).

Дополнительно, можно удалять сайты N-гликозилирования в качестве способа снижения эффекторной функции. В данной области техники известно большое количество вариантов Fc с измененной и/или уменьшенной аффинностью для некоторых или всех подтипов рецепторов Fc (и, следовательно, для эффекторных функций). Смотрите, например, патенты US 2007/0224188, US 2007/0148171, US 2007/0048300, US 2007/0041966, US 2007/0009523, US 2007/0036799, US 2006/0275283, US 2006/0235208, US 2006/0193856, US 2006/0160996, US 2006/0134105, US 2006/0024298, US 2005/0244403, US 2005/0233382, US 2005/0215768, US 2005/0118174, US 2005/0054832, US 2004/0228856, US 2004/132101, US 2003/158389; см также патенты US 7183387, 6737056, 6538124, 6528624, 6194551, 5624821, 5648260.

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

проявляет аффинность связывания с FcγRIIa в 1,5, 2, 2,5, 3, 4, в 5 раз или еще ниже.

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

Было высказано предположение, что в связывание с C1q вовлечены различные остатки молекулы IgG, включающие в себя остатки Glu318, Lys320 и Lys322 в домене CH2, аминокислотный остаток 331, расположенный, в свою очередь, в непосредственной близости от той же бета-цепи, остатки Lys235 и Gly237, расположенные в нижней шарнирной области, и остатки от 231 до 238, расположенные в N-концевой области домена CH2 (смотрите, например, Xu et al., *J. Immunol.* 150: 152A (Abstract) (1993), W094/29351; Tao et al, *J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993); Brekke et al, *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47 (1994); Burton et al; *Nature*, 288:338-344 (1980); Duncan and Winter, *Nature* 332:738-40 (1988); Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000; US 5648260, US 5624821).

Антитела против BDCA2 с улучшенным связыванием с C1q могут содержать аминокислотную замену в одном, двух, трех или четырех положениях аминокислот 326, 327, 333 и 334 Fc-области человеческого IgG, где нумерация остатков в Fc-области IgG

соответствует индексу EU по Kabat. В одном из вариантов осуществления антитела против BDCA2 включают следующие аминокислотные замены: K326W/E333S, которые достоверно увеличивают связывание IgG1 антитела с C1q (Steurer W. Et al, J. Immunol, 155 (3): 1165-74 (1995)).

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

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

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

В некоторых других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам против BDCA2, которые

проявляют пониженное связывание с одним или несколькими рецепторами FcR, но сохраняют свою способность связываться с комплементом (например, в той же степени, или, в некоторых вариантах осуществления, в меньшей степени, чем нативное, невариантное или исходное антитело против BDCA2). Соответственно, антитела против BDCA2 по настоящему изобретению могут связываться и активировать комплемент, и в то же время проявлять уменьшенное связывание с Fc-рецептором, таким как, например, FcγRIIa (например, FcγRIIa, который экспрессируется на тромбоцитах). Такое антитело с уменьшенным или отсутствующим связыванием с FcγRIIa (например, с FcγRIIa, экспрессируемым на тромбоцитах), но которое может связываться C1q и активировать, по меньшей мере в некоторой степени, каскад комплемента, будет уменьшать риск тромбозмболических осложнений при сохранении возможно желательных эффекторных функций. В альтернативных вариантах осуществления антитела против BDCA2 по настоящему изобретению проявляют уменьшенное связывание с одним или несколькими Fc-рецепторами, но сохраняют свою способность связываться с одним или несколькими другими FcR. Смотрите, например, патенты US 2007-0009523, 2006-0194290, 2005-0233382, 2004-0228856 и 2004-0191244, в которых описаны различные модификации аминокислот, создающие антитела с уменьшенным связыванием с FcRI, FcRII и/или FcRIII, а также аминокислотные замены, которые приводят к увеличению связывания с одним FcR, но к снижению связывания с другим FcR.

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

Нативная последовательность Fc-области или константной

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

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

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

Другие варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителу против BDCA2, содержащему одну или несколько последовательностей CDR легкой цепи, которые выбирают из CDR1 VL из SEQ ID NO:5, CDR2 VL из SEQ ID NO:6 и CDR3 VL из SEQ ID NO:7; или одну или несколько альтернативных последовательностей CDR легкой цепи, которые выбирают из CDR1 VL из SEQ ID NO:95, CDR2 VL из SEQ ID NO:96 и CDR3 VL из SEQ ID NO:97, при этом антитело дополнительно содержит вариантную Fc-область, которая обуславливает повышение или снижение

эффекторной функции по сравнению с нативной или исходной Fc-областью. В других вариантах осуществления антитело против BDCA2 содержит по меньшей мере две последовательности из CDR легкой цепи (или альтернативные CDR), и в других вариантах осуществления антитело содержит все три последовательности CDR легкой цепи (или альтернативные CDR). Такие антитела против BDCA2 (i) ингибируют секрецию интерферонов типа I и/или интерферонов типа III в дополнение к другим цитокинам и хемокинам из плазмцитоидных дендритных клеток; и/или (ii) индуцируют или усиливают истощение плазмцитоидных дендритных клеток *in vitro*.

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

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

Способы создания какого-либо из вышеуказанных вариантов антител против BDCA2, содержащих аминокислотные замены, хорошо известны в данной области техники. Эти способы включают без ограничения получение с помощью сайт-направленного (или олигонуклеотид-опосредованного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученной молекулы ДНК, кодирующей это антитело или по меньшей мере константную область этого антитела. Сайт-направленный мутагенез хорошо известен в данной

области (смотрите, например, Carter et al, Nucleic Acids Res., 13: 4431-4443 (1985) и Kunkel et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1987)). ПЦР-мутагенез также подходит для получения вариантов аминокислотной последовательности исходного полипептида. Смотрите Higuchi, в руководстве PCR Protocols, стр.177-183 (Academic Press, 1990); и Vallette et al, Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989). Кассетный мутагенез представляет собой другой способ получения вариантных последовательностей, который основан на методике, описанной Wells et al, Gene, 34: 315-323 (1985).

Антитела против BDCA2 с измененным гликозилированием

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

Соответственно, другие способы модуляции эффекторной функции антител включают изменение гликозилирования константной области антитела. Измененное гликозилирование включает, например, уменьшение или увеличение количества гликозилированных остатков, изменение характера или местоположения гликозилированных остатков, а также изменение структуры сахара (сахаров). Олигосахариды, обнаруживаемые в человеческих IgG, влияют на степень их эффекторной функции (Raju T.S., BioProcess International April 2003, 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов человеческих IgG может

влиять на биологические функции, такие как CDC и ADCC, связывание с различными Fc-рецепторами и связывание с белком Clq (Wright A. and Morrison S.L. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J. Biol. Chem. 2001 276(9): 6591-604; Shields et al. J. Biol. Chem. 2002; 277(30): 26733-40; Shinkawa et al. J. Biol. Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et al. Nat. Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176-80). Например, способность IgG связываться с Clq и активировать каскад комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводной группы, расположенной между двумя доменами CH2 (который обычно заякорен на Asn297) (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)).

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

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

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

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

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

Показания

Антитела против BDCA2 по изобретению, можно применять для лечения или предотвращения различных иммунологических нарушений, таких как воспалительные и аутоиммунные расстройства. Антитела против BDCA2 являются полезными для лечения или профилактики таких заболеваний по меньшей мере потому, что они нарушают функцию или истощают клетки pDC, и/или ингибируют воспалительные цитокины и хемокины, продуцируемые клетками pDC, и/или подавляют CD32a, и/или ингибируют стимуляцию иммунных комплексов посредством pDC, и/или подавляют или вызывают шеддинг CD62L. Антитела против BDCA2 по изобретению можно комбинировать с противомаларийным агентом

(например, с HCQ) для улучшения терапевтического эффекта при лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Антитела против BDCA2 можно использовать для снижения уровня цитокинов и хемокинов, таких как: интерфероны I типа, интерфероны III типа, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, CCL5/RANTES или IP10/CXCL10. Интерфероны I типа составляют многочисленное семейство цитокинов, включающих 13 подтипов ИФН α , ИФН- β , - ϵ , - κ , - ω , - δ и - τ (Theofilopoulos, Annu. Rev. Immunol, 23:307-36 (2005)). Интерфероны типа III состоят из трех молекул ИФН- λ , называемых ИФН- λ 1, ИФН- λ 2 и ИФН- λ 3 (называемых ИЛ-29, ИЛ-28A и ИЛ-28B, соответственно). Антитела против BDCA2 по изобретению путем истощения и/или подавления функции pDC обеспечивают более надежный подход к лечению, чем методики лечения, пытающиеся снизить содержание специфичных подтипов ИФН с помощью нейтрализующих антител. Дополнительно, подход с pDC-ориентированным лечением антителами против BDCA2 является более селективным и потенциально безопаснее, чем глобальная блокада ответа ИФН. Например, антитела против BDCA2 по изобретению эффективно устраняют pDC-продуцируемые интерфероны типа I, сохраняя при этом другие источники ИФН, которые могут быть необходимы в случае вирусных инфекций.

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

Заболевания или состояния, которые можно лечить с помощью антитела против BDCA2 по изобретению, включают, например, системную красную волчанку (СКВ) (например, волчанку в средней и тяжелой степени тяжести), кожную волчанку, дискоидную волчанку, волчаночный нефрит, системный склероз (склеродермию), кольцевидную склеродерму, псориаз, ревматоидный артрит,

воспалительную болезнь кишечника (ВБК), дерматомиозит, полимиозит и диабет типа I.

СКВ представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, при котором множество органов повреждается иммунными комплексами и аутоантителами, связывающимися с тканями (смотрите Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults, Arthritis & Rheumatism, 42(9): 1785- 1795 (1999)). Аутоантитела присутствуют при СКВ и могут предшествовать развитию клинического заболевания (Arbuckle et al, N. Engl. J. Med., 349(16): 1526-33 (2003)). Интернализация иммунных комплексов, содержащих аутоантитела, посредством Fc-рецепторов приводит к выработке интерферона I типа, что в свою очередь способствует снижению толерантности и закреплению порочного круга аутоиммунности (Means et al, Ann N Y Acad Sci., 1062:242-51 (2005)). СКВ является гетерогенной в отношении своего клинического проявления, течения и прогноза заболевания и генетических факторов. Афроамериканцы имеют повышенный риск развития СКВ, которая часто проявляется в более тяжелой степени по сравнению с белыми пациентами. Ранее было выявлено, что недостаток комплемента является фактором риска для развития СКВ. Еще раньше было описано, что эта предрасположенность обусловлена генетическим полиморфизмом, связанным с сигнальным путем интерферона I типа. Например, анти-двухцепочечная ДНК и анти-Ro аутоантитела связаны с определенным гаплотипом регуляторного фактора 5, фактора транскрипции интерферона (IRF5). Этот гаплотип также является прогностическим для высокого уровня ИФН α в сыворотке крови больных СКВ (Niewold et al, Ann. Rheum. Dis., 71(3):463-8 (2012)). Более высокие уровни ИФН α коррелируют с большей распространенностью полиорганного поражения у больных СКВ (Bengtsson et al, Lupus, 9 (9): 664-71 (2000)). Кроме того, заметным фактором при СКВ является так называемая "интерфероновая подпись". Интерфероновая подпись представляет собой паттерн экспрессии мРНК индуцибельных генов интерферона. Подпись интерферона I типа выявляется более чем у половины

больных СКВ и связана с более активным развитием заболевания (Baechler et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 (5): 2610-5 (2003)). В клиническую практику уже вошли моноклональные антитела ИФН α , и результаты 1 фазы клинических испытаний сифалимумаба и ронтализумаба показали дозозависимое снижение подписи ИФН типа I в цельной крови больных СКВ (McBride et al, Arthritis Rheum., 64(11): 3666-76 (2012); Yao et al, Arthritis Rheum., (6): 1785-96 (2009)). Были разработаны достоверные показатели для оценки активности заболевания и степени тяжести заболевания (например, средней степени, тяжелое) (смотрите, например, Gladman, Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus, Curr. Opin. Rheumatol., 8:430-437 (1996); Kalunian et al, Definition, classification, activity and damage indices. в книге: Dubois' lupus erythematosus. 5th ed., Baltimore: Williams and Wilkins; стр. 19-30 (1997)).

Системный склероз или системная склеродермия представляет собой системное аутоиммунное заболевание или системное заболевание соединительной ткани, которое является подтипом склеродермии. Оно характеризуется отложением коллагена в коже и, реже, в почках, сердце, легких и желудке. Соотношение женщин и мужчин при этом заболевании составляет 4:1. Пиковый возраст начала заболевания находится в диапазоне от 30 до 50 лет.

Псориаз является аутоиммунным заболеванием, которое поражает кожу. Оно возникает, когда иммунная система ошибочно воспринимает клетки кожи, как патоген, и посылает ложные сигналы, которые ускоряют цикл роста клеток кожи. Псориаз связан с повышенным риском инсульта, и лечение высокого уровня липидов в крови может приводить к улучшению. Выделяют пять типов псориаза: чешуйчатый, каплевидный, пустулярный, эритродермический и псориаз складок. Наиболее распространенной формой является чешуйчатый псориаз, обычно проявляющийся в виде красноватых и беловатых чешуйчатых пятен, которые возникают на верхнем первом слое эпидермиса. Вместе с тем, у некоторых пациентов не выявляется дерматологических признаков или симптомов.

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим воспалительным заболеванием, которое захватывает многие органы и ткани, но главным образом поражает гибкие суставы. Заболевание протекает в виде воспалительной реакции околосуставной капсулы вследствие отека синовиальных клеток, появления избытка синовиальной жидкости, а также развития фиброзной ткани (паннуса) в синовиальной оболочке. Патологический процесс РА часто приводит к разрушению суставного хряща и анкилозу суставов. Ревматоидный артрит может также вызывать диффузное воспаление легких, мембраны, окружающей сердце (перикард), мембраны легких (плевры) и белка глаза (склеры), а также нодулярные поражения, наиболее распространенные в подкожной клетчатке. Хотя причина ревматоидного артрита неизвестна, ключевую роль в его хронизации и прогрессировании играют аутоиммунные механизмы, и РА считается системным аутоиммунным заболеванием. У пациентов, страдающих артритом, наблюдается сверхэкспрессия ФНО α и других провоспалительных цитокинов (Feldmann et. al, *Prog. Growth Factor Res.*, 4: 247-55 (1992)). Кроме того, у трансгенных животных со сверхэкспрессией человеческого ФНО α развивается эрозивный полиартрит со многими показателями, связанными с этим заболеванием (Keffer et. al, *EMBO J.*, 10(13): 4025-31 (1991)). Для подавления симптомов применяют анальгетические и противовоспалительные препараты, включающие в себя стероиды, а для подавления или прекращения основного иммунного процесса и предотвращения продолжительного повреждения необходимы болезнь-модифицирующие противоревматические препараты (БМАРП). Ранее для контроля заболевания применяли лечение анти-ФНО α антителом (ритуксимаб) (Edwards et al., *N. Engl. J. Med.*, 350 (25): 2572-81 (2004)).

Воспалительная болезнь кишечника (ВБК) представляет собой группу воспалительных заболеваний толстой кишки и тонкой кишки. Основными типами ВБК являются болезнь Крона и язвенный колит (ЯК). Основное различие между болезнью Крона и ЯК заключается в локализации и характере воспалительных изменений: болезнь Крона

может поражать любую часть желудочно-кишечного тракта, от ротовой полости до ануса (сегментарные поражения), хотя в большинстве случаев начинается с подвздошной кишки; тогда как ЖК ограничивается толстой кишкой и прямой кишкой. В зависимости от степени тяжести, для контроля симптоматики при ВБК может потребоваться иммуносупрессия, например, преднизон, ингибирование ФНО, азатиоприн (Имуран), метотрексат или 6-меркаптопурин. Чаще всего, для лечения ВБК необходима форма месалазина.

Дерматомиозит (ДМ) является типом аутоиммунного заболевания соединительной ткани, связанного с полимиозитом (ПМ), которое характеризуется воспалением мышц и кожи. Наиболее часто ДМ поражает кожу и мышцы, но вместе с тем, представляет собой системное заболевание, которое также может поражать суставы, пищевод, легкие, и, реже, сердце.

Полимиозит (ПМ) ("множественное воспаление мышц") предстает собой тип хронического воспаления мышц (воспалительная миопатия), связанного с дерматомиозитом и миозитом с тельцами включения.

Диабет типа I является формой сахарного диабета, возникающего в результате аутоиммунного разрушения инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы. Обусловленный этим недостаток инсулина приводит к увеличению уровня глюкозы в крови и моче. Классическими симптомами являются полиурия, полидипсия, полифагия и потеря веса.

Примеры других заболеваний, подходящих для лечения описанными в изобретении антителами против BDCA2, включают астму, болезнь Бехчета, CREST-синдром, болезнь Крона, дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, сахарный диабет, дискоидная красная волчанка, легочный фиброз, аутоиммунный гломерулонефрит, мембранную гломерулопатию, ювенильный ревматоидный артрит (ювенильный хронический артрит), смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, нефротический синдром, панникулит, пемфигоид, пузырчатку, эритематозную пузырчатку, эксфолиативную пузырчатку, пузырчатку обыкновенную, ревматическую полимиалгию, системный склероз,

прогрессирующий системный склероз (склеродермию), кольцевидную склеродермию (очаговую склеродермию), рассеянный склероз, псориаз, псориатический артрит, легочный фиброз, синдром/феномен Рейно, синдром Шегрена и язвенный колит.

Индивиду, который имеет риск возникновения вышеперечисленных болезней, у которого диагностирована или имеется одна из этих патологий, можно вводить антитела против BDCA2 в таком количестве и в течение такого времени, чтобы достичь общего терапевтического эффекта. Антитела против BDCA2 можно вводить как единственный препарат (монотерапия), так и в комбинации с другими агентами (комбинированная терапия). В одном из вариантов осуществления противомаларийное средство является средством для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении. В одном из вариантов осуществления средством для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, является ингибитор сигнального пути TLR7 и/или TLR9. В другом варианте осуществления средством для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, является кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления агент для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, представляет собой противомаларийный препарат и/или ингибитор киназы (например, ингибитор BTK (например, ибрутиниб (PCI-32765), AVI-292, ONO-0-0-WG-307), ингибитор JAK1, ингибитор JAK2, ингибитор JAK3, ингибитор Tyk2). В конкретном варианте осуществления агент для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, представляет собой гидроксихлорохин. Количество и сроки введения при комбинированной терапии могут быть такими, которые обеспечивают, например, аддитивный или синергический терапевтический эффект. Кроме того, введение антитела против BDCA2 (со вторым средством или без него) можно использовать в качестве первичного лечения, например, терапии первой линии или в качестве вторичного лечения, например, для индивидов, которые проявляют неадекватный ответ на ранее вводимые препараты (т.е.

на терапию, отличную от лечения антителом против BDCA2). В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает применение антитела против BDCA2 и одного или нескольких из следующих агентов: глюкокортикоид, НПВС, преднизон, гидроксихлорохин, хлорохин, амодиахин, пириметамин, прогванил, мефлохин, дапсон, примахин, метотрексат, микофенолат мофетил, азатиоприн, талидомид, циклофосфамид, циклоспорин А, рапамицин, простациклин, ингибитор фосфодиэстеразы, антагонисты эндотелина, статины, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и блокаторы кальциевых каналов. В других вариантах осуществления комбинированная терапия включает применение антитела против BDCA2 и любого одного или нескольких из следующих агентов: сульфасалазин, доксициклин, миноциклин, пеницилламин, тофацитиниб и лефлуномид.

Фармацевтические композиции

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

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

0683305727); и Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

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

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

Фармацевтические композиции могут также включать агенты, которые уменьшают агрегацию антитела против BDCA2 или антигенсвязывающего фрагмента при получении композиции. Примеры снижающих агрегацию агентов включают одну или несколько аминокислот, выбираемых из группы, состоящей из метионина, аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты, глицина и глутаминовой кислоты. Эти аминокислоты можно добавлять в композицию в концентрации от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 145 мМ (например, 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 мМ. Фармацевтические композиции могут также включать сахар (например, сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит или ксилит) и/или модификатор тоничности (например, хлорид натрия, маннит или сорбит) и/или поверхностно-активное вещество (например, полисорбат-20 или

полисорбат-80).

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

Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные инъекционные растворы можно приготовить путем включения в них описанного в изобретении агента в необходимом количестве в подходящем растворителе, с одним ингредиентом или с комбинацией перечисленных выше ингредиентов, как это необходимо, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии делают путем включения описанного в изобретении агента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием, в результате чего получают порошок из описанного в изобретении агента плюс какой-либо дополнительный желательный ингредиент из раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием. Можно сохранять надлежащую

текучесть раствора, например, с помощью использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратные соли и желатин.

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

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, B1B059) в концентрации приблизительно от 0,5 до 300 мг/мл (например, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 мг/мл), с добавлением в рецептуру цитрата натрия, хлорида натрия и необязательно Твин-80 (0,01-0,1%, например, 0,03%, 0,05% или 0,7%). Уровень pH композиции может быть в пределах от 5,5 до 7,5 (например, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,3).

Введение

Антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить индивиду, например, нуждающемуся в этом индивиду, например, индивиду-человека, различными способами. Для многих применений путем введения является один из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (в/в), подкожная инъекция

(п/к), внутрибрюшинная (в/б) или внутримышечная инъекция. Также можно применять внутрисуставную доставку. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примеры таких путей введения включают: внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, внутриорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, транстрахеальные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, спинальные, эпидуральные и внутритрудинные инъекции. В некоторых случаях введение может быть пероральным.

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

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозировке мг/кг. Также можно выбирать дозу с тем, чтобы уменьшить или не допустить выработки антител против антитела против BDCA2. Схемы дозирования регулируют таким образом, чтобы обеспечить желаемую реакцию, например, терапевтический ответ или комбинаторной терапевтический эффект. В общем, дозы антитела против BDCA2 (и необязательно второго средством) можно использовать для обеспечения индивида этим средством в биодоступном количестве. Например, можно вводить дозы в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг, от 0,5 до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,5 до 20 мг/кг, от 0,1 до 10 мг/кг или от 1 до 10 мг/кг. Также можно применять другие дозы. В конкретных вариантах осуществления индивиду, нуждающемуся в лечении антителом против BDCA2, вводят антитело в дозе 2, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 35 или 40 мг/кг.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент находятся в

композиции преимущественно в мономерной форме, например, мономерная форма составляет по меньшей мере приблизительно 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 98,5% или 99% композиции. Некоторые композиции антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента могут содержать агрегаты в количестве менее чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3 или 0,1%, что определяют, например, с помощью УФ при 280 нм. Некоторые композиции антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента содержат менее чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2 или 0,1% фрагментов, что определяют, например, с помощью УФ при 280 нм.

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

Дозу антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента можно вводить, например, с периодическим интервалом в течение определенного периода времени (курс лечения), достаточного для введения по меньшей мере 2, 3, 5, 10 доз или больше, например, один раз в день или два раза в день, или приблизительно от одного до четырех раз в неделю, или предпочтительно один раз в неделю, один раз в две недели (каждые две недели), каждые три недели, каждый месяц, например, в течение приблизительно от 1 до 12 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно приблизительно от 3 до 7 недель, и еще более предпочтительно приблизительно 4, 5 или 6 недель. Факторы, которые могут оказывать влияние на дозировку и время, необходимые для эффективного лечения индивида, включают, например, степень тяжести заболевания или расстройства,

композицию, пути введения, предшествующие курсы лечения, общее состояние здоровья и/или возраст индивида, а также наличие других заболеваний. Кроме того, лечение индивида терапевтически эффективным количеством соединения может включать единственный вид лечения или, предпочтительно, может включать ряд лечебных мероприятий.

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

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

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

осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно в концентрации 50 мг/мл. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно в концентрации 50 мг/мл.

Устройства и наборы для лечения

Фармацевтические композиции, которые включают антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, могут вводиться с помощью медицинского устройства. Устройство может быть разработано с такими свойствами, как портативность, возможность хранения при комнатной температуре и простота в использовании, с тем, чтобы его можно было использовать в чрезвычайных ситуациях, например, неподготовленным индивидом или персоналом неотложных служб "в поле", удаленном от медицинских учреждений и другого медицинского оборудования. Устройство может включать, например, одну или несколько емкостей для хранения фармацевтических препаратов, которые включают антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, и может быть настроено для доставки одной или нескольких единичных доз антитела. Устройство может быть дополнительно скомпоновано для введения второго средства, например, химиотерапевтического средства, как в виде монолитной фармацевтической композиции, которая также включает антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, так и в виде двух отдельных фармацевтических композиций.

Фармацевтическую композицию можно вводить с помощью шприца. Фармацевтическую композицию можно также вводить с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций, например, с помощью устройств, раскрытых в патентах США № 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей описаны в следующих патентах, включающих: US 4487603, в котором раскрывается имплантируемая микро-инфузионная помпа для

дозирования лекарства с регулируемой скоростью; US 4486194, в котором раскрывается терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; US 4447233, в котором раскрывается инфузионная лекарственная помпа для доставки лекарства с точной скоростью инфузии; US 4447224, в котором описано имплантируемое инфузионное устройство с переменным потоком для непрерывной доставки лекарства; US 4439196, в котором раскрывается осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отделения; и US 4475196, в котором раскрывается осмотическая система доставки лекарственного средства. Также известно множество других устройств, имплантатов, систем доставки и модулей.

Антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент может быть представлен в виде набора. В одном из вариантов осуществления набор содержит (а) контейнер, содержащий композицию, которая включает антитело против BDCA2 и, необязательно, (b) информационные материалы. Информационный материал может представлять собой описание, инструкцию, маркетинговый или другой материал, который относится к способам, описанным в изобретении, и/или к применению этих агентов для терапевтического эффекта.

В одном из вариантов осуществления набор также включает второй агент для лечения заболевания по изобретению (например, ингибитор ВТК, противомаларийный агент, глюкокортикоид, НПВС, преднизон, гидроксихлорохин, амодиахин, пириметамин, прогванил, сульфаниламиды, мефлохин, атоваквон, примахин, артемизинин и его производные, галофантрин, доксициклин, клиндамицин, метотрексат, микофенолат мофетил, азатиоприн, циклофосфамид, сульфасалазин или лефлуномид). Например, набор включает первый контейнер, содержащий композицию, которая включает антитело против BDCA2, и второй контейнер, который включает второй агент.

Форма информационного материала из наборов не ограничена. В одном из вариантов осуществления информационный материал может включать информацию о получении соединения, молекулярной массе соединения, концентрации, о дате истечения срока

действия, информацию о партии или месте производства, и так далее. В одном из вариантов осуществления информационный материал относится к способам введения антитела против BDCA2 или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в соответствующей дозе, лекарственной форме или относится к способу введения (например, к лекарственной форме или способу введения, описанным в изобретении), для лечения индивида с иммунологическим заболеванием, описанным в изобретении, или индивида из группы риска по этому заболеванию. Информация может быть представлена в различных форматах, включающих печатный текст, материал для чтения на компьютере, видеозапись, звукозапись или информацию, которая содержит адрес или ссылку по существу материала, например, в Интернете.

В дополнение к антителу, композиция в наборе может включать другие ингредиенты, такие как растворитель или буфер, стабилизатор или консервант. Антитело может быть представлено в любой форме, например, в жидкой, сухой или лиофилизированной форме, предпочтительно, по существу в чистой и/или стерильной форме. Если агенты находятся в жидком растворе, жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор. Если агенты представлены в сухой форме, ее обычно восстанавливают путем добавления подходящего растворителя. В наборе необязательно поставляется растворитель, например, стерильная вода или буфер.

Набор может включать один или несколько контейнеров для композиции или композиций, содержащих агенты. В некоторых вариантах осуществления набор содержит отдельные контейнеры, разделители или отделения для композиции и информационных материалов. Например, композиция может содержаться во флаконе, в пробирке или шприце, и информационный материал может содержаться в пластиковом чехле или пакете. В других вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в едином неразделенном контейнере. Например, композиция находится во флаконе, пробирке или шприце, которые снабжены информационным материалом в виде присоединенной к ним этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор содержит множество (например, упаковку) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит

одну или несколько единичных дозированных форм (например, лекарственных форм по изобретению) агентов. Контейнеры могут включать комбинированную единичную дозу, например, единичную дозу, которая включает и антитело против BDCA2 или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй агент, например, в желательном соотношении. Например, набор включает множество шприцев, ампул, фольгированных упаковок, блистерных упаковок или медицинских устройств, например, каждый из которых содержит монолитную комбинированную дозу. Контейнеры с наборами могут быть герметичными, водонепроницаемыми (например, непроницаемыми для изменения влажности или испарения) и/или светонепроницаемыми.

Набор дополнительно включает устройство, подходящее для введения композиции, например, шприц или другое подходящее устройство для доставки. Устройство может быть предварительно заполнено одним или обоими средствами, или может быть пустым, но подходящим для наполнения.

Диагностические применения

Антитела против BDCA2 или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы в качестве диагностического способа для обнаружения присутствия BDCA2 *in vitro* (например, в биологическом образце, например, в ткани, биоптате) или *in vivo* (например, при визуализации индивида *in vivo*). Например, антитела против BDCA2 человека или эффективные антитела против BDCA2 человека можно вводить индивиду для обнаружения BDCA2 внутри индивида. Например, антитело может быть меченым, например, с помощью метки или радиоактивной метки, обнаруживаемой на МРТ. Индивид может подвергаться исследованию способом детекции обнаруживаемой метки. Например, можно проводить сканирование индивида для оценки локализации антитела внутри индивида. Например, получают изображение индивида, например, с помощью ЯМР или других способов томографии.

Примеры меток, эффективных для диагностической визуализации, включают радиоактивные метки, такие как ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C и ^{188}Rh , флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, активные метки для

ядерного магнитного резонанса, позитронно-излучающие изотопы, обнаруживаемые с помощью позитронно-эмиссионного томографического сканера ("ПЭТ"), хемилюминисценты, такие как люциферин, и ферментативные маркеры, такие как пероксидаза или фосфатаза. Также можно использовать эмиттеры короткопробежного излучения, например, изотопы, обнаруживаемые детекторными зондами короткопробежного излучения. Белковый лиганд может быть меченым указанными реагентами с помощью известных способов. Например, в отношении способов, относящихся к радиомечению антител, смотрите Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, и Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816.

Индивид может быть "визуализирован" *in vivo* с помощью известных способов, таких как радионуклидное сканирование с использованием, например, гамма-камеры или эмиссионной томографии. См, например, A.R. Bradwell et al, "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al, (eds.), стр. 65-85 (Academic Press, 1985). В качестве альтернативы можно использовать трансаксиальный сканер для позитронно-эмиссионной томографии, например, сканер Pet VI, расположенный в национальной лаборатории Brookhaven National Laboratory, в котором радиоактивная метка испускает позитроны (например, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N).

Магнитно-резонансная томография (МРТ) использует ЯМР для визуализации внутренних признаков живого индивида и является эффективной для прогнозирования, диагностики, лечения и хирургического вмешательства. Можно использовать МРТ с очевидной пользой без радиоактивных меченых соединений. Некоторые способы МРТ приведены в патенте EP0 502814 A. В целом, для создания изображения используются различия, связанные со временем релаксации константы T1 и T2 протонов воды в различных средах. Тем не менее, этих различий может быть недостаточно для получения четких изображений с высоким разрешением.

Различия в этих константах времени релаксации могут быть

усилены с помощью контрастных веществ. Примеры таких контрастных агентов включают ряд магнитных агентов, парамагнитных агентов (которые, прежде всего, изменяют T_1) и ферромагнитных или суперпарамагнитных агентов (которые в первую очередь изменяют ответ T_2). Можно использовать хелаты (например, хелаты ЭДТА, ДТРА и НТА) для присоединения (и снижения токсичности) некоторых парамагнитных веществ (например, Fe^{3+} , Mn^{2+} , Gd^{3+}). Другие агенты могут быть в форме частиц, например, диаметром от менее чем 10 мкм до приблизительно 10 нм). Частицы могут иметь ферромагнитные, анти-ферромагнитные или суперпарамагнитные свойства. Частицы могут включать, например, магнетит (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ферриты и другие магнитные минеральные соединения переходных элементов. Магнитные частицы могут включать один или несколько магнитных кристаллов с немагнитным материалом и без него. Немагнитный материал может включать синтетические или природные полимеры (например, сефарозу, декстран, декстрин, крахмал и т.п.).

Антитела против BDCA2 или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть также мечены с помощью индикаторной группы, содержащей ЯМР-активный атом ^{19}F или множество таких атомов, поскольку (i), присутствующие в природе в изобилии атомы фтора по существу представляют собой ^{19}F изотопы, и, таким образом, практически все фторсодержащие соединения являются ЯМР-активными; (ii) многие химически активные полифторированные соединения, такие как трифторуксусный ангидрид, коммерчески доступны по относительно низкой цене; и (iii) было выявлено, что для применения у людей приемлемы с медицинской точки зрения многие фторированные соединения, такие как перфторированные полиэфиры, используемые для переноса кислорода в качестве заменителей гемоглобина. После проведения инкубации в течение положенного времени осуществляют МРТ всего тела с помощью аппарата, например, одного из описанных в публикации Rykett (1982) *Scientific American*, 246: 78-88, для определения локализации и визуализации распределения BDCA2.

В другом аспекте изобретение относится к способу

обнаружения присутствия BDCA2 в образце *in vitro* (например, в биологическом образце, таком как сыворотка, плазма, ткань, биоптат). Рассматриваемый способ можно использовать для диагностики заболеваний, например, аутоиммунных заболеваний (например, СКВ) или для обнаружения уровней pDC в образце. Способ включает: (i) контактирование образца или контрольного образца с антителом против BDCA2; и (ii) оценку образца на наличие BDCA2, например, путем обнаружения образования комплекса между антителом против BDCA2 и BDCA2, или путем обнаружения присутствия антитела или BDCA2. Например, антитело можно иммобилизовать, например, на матрице, и выявлять удержание антигена на матрице и/или наоборот. Используемое антитело может быть меченым, например, флуорофором. Можно включать в исследование контрольный образец. Положительным контролем может быть образец с достоверным наличием заболевания или расстройства, в отношении которого проводят исследование, и отрицательным контролем может быть образец от индивида, который не имеет исследуемое заболевание или расстройство. Статистически значимое изменение в образовании комплекса в образце по сравнению с контрольным образцом может свидетельствовать о наличии BDCA2 в образце. Обычно антитела против BDCA2 можно использовать в применениях, которые включают поляризацию флуоресценции, микроскопию, ELISA, центрифугирование, хроматографию и сортировку клеток (например, сортировку клеток с активацией флуоресценции). В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 представляет собой BIIIB059 или клон Dendritics 124B3.13. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно охватывает образец иммунной ткани с анти-CD123 антителом. Образцом ткани может быть, например, биоптат кожи от больных людей с аутоиммунными заболеваниями, например, СКВ.

Ниже приведены примеры практического осуществления изобретения. Их не следует толковать как какое-либо ограничение объема изобретения.

Примеры

В целях лучшей иллюстрации заявляемого изобретения

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

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

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

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

Для ПЦР-амплификации мышинных переменных доменов иммуноглобулина с интактными сигнальными последовательностями был использован коктейль из вырожденных прямых праймеров, которые гибридизуются с множеством сигнальных последовательностей семейства генов мышиногo иммуноглобулина и единственного обратного праймера, специфичного для 5'-конца мышиногo константного домена, как описано в Current Protocols in Immunology (Willey and Sons, 1999). Переменный домен тяжелой цепи 24F4 амплифицировали со следующими праймерами: 5' АСТ АГТ СГА САТ ГРА СТТ ТГГ ГYT СAG СТТ ГРТ ТТ 3' (R=A/G и Y=C/T) (SEQ ID NO:25) и 5' АГГ ТСТ АГА АYC ТСС АСА САС АГГ RRC САГ ТГГ АТА ГАС 3' (R=A/G и Y=C/T) (SEQ ID NO:26). Переменный

домен легкой цепи 24F4 с ее сигнальной последовательностью амплифицировали со следующими праймерами: 5' ACT AGT CGA CAT GGA GWC AGA CAC ACT CCT GYT ATG GGT 3' (W=A/T и Y=C/T) (SEQ ID NO:27) и 5' GCG TCT AGA ACT GGA TGG TGG GAG ATG GA 3' (SEQ ID NO:28).

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

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

Переменный домен (VH) тяжелой цепи мышиного 24F4 является членом мышиной подгруппы III (D). Ниже показана последовательность зрелой переменной области тяжелой цепи мышиного 24F4 с CDR H1, CDR H2 и CDR H3, которая подчеркнута, в следующем порядке:

```

1  DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLEWVAT
51 ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD

```

101 IYYNYGAWFA YWGQGLVTV SA (SEQ ID NO:29)

Вариабельный домен легкой цепи (VL) мышиногo 24F4 является членом подгруппы III мышиной каппа. Последовательность зрелогo вариабельного домена легкой цепи мышиногo 24F4 CDR L1, CDR L2 и CDR L3, подчеркнутая в таком порядке, показана ниже:

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

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

Пример 2. Химеризация мышиногo антитела 24F4

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

Вариабельные домены были впервые сконструированы с помощью ПЦР для добавления 5' последовательности Козака и для введения человеческих последовательностей и новых сайтов рестрикции в сочленения FR4/константных доменов, для слияния с константными доменами человеческого иммуноглобулина. Последовательности вариабельной области кДНК в полученных плаزمидах подтверждали путем секвенирования ДНК. Вариабельный домен тяжелой цепи в плазмиде pYL647 использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 5' GAT CCG CGG CCG CAC CAT GGA CTT TGG GTT CAG CTT G 3' (SEQ ID NO:31) (добавление сайта NotI и последовательности Козака) и 5' GAT GGG CCC TTG GTG GAA GCT GCA GAG ACA GTG ACC AGA G 3' (SEQ ID NO:32) (добавление сайта ApaI и последовательности CH1 человеческого IgG1 на сочленение FR4/константный домен), и проводили амплификацию 0,45 кб фрагмента, который очищали и субклонировали в клонирующий вектор Invitrogen pCRBlunt11TOPO, создавая pYL668. Для конструирования химерной тяжелой цепи фрагмент 0,45 кб NotI-ApaI из конструкции pYL668 вариабельного домена тяжелой цепи

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

```

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

```

А-гликозилированная форма с низкой эффекторной функцией ch24F4 также была сконструирована путем субклонирования фрагмента 0,45 кб *Not*I-*Apa*I из конструкции pYL668 переменного домена тяжелой цепи 24F4 и фрагмента 0,98 кб *Apa*I-*Bam*HI из pEAG2412 (плазмиды, содержащей подтвержденную последовательность кДНК константного домена гибридной тяжелой цепи S228P/N299Q *huIgG4/IgG1* с генетически удаленным С-концевым остатком лизина *IgG1*), субклонирована в каркас вектора экспрессионного вектора pV90, создавая плазмиду pYL670. Последовательность кДНК тяжелой цепи в полученной плазмиде pYL670 была подтверждена секвенированием ДНК. Выведенная зрелая последовательности белка гибридной тяжелой цепи agly ch24F4-

huIgG4/GL, кодируемая pYL670, показана ниже:

```

1  DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLEWVAT
51  ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGTLLTV SAASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
201 KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFQS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG
(SEQ ID NO:34)

```

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

показана ниже:

```

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

```

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

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

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

Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием набора для мутагенеза QuikChange II фирмы Agilent согласно протоколу, рекомендованному производителем. Вариант C95S был сконструирован с использованием мутагенного праймера 5' GCA ACC

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

Пример 4. Примеры тяжелых и легких цепей гуманизированного 24F4

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

Вариант H0

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS
VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ
ID NO:40)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGTTCGCCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTGCTATTAGTGGTAGCGGAGGTAGTACATACTATGCAGACAGT
GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATGAAC
AGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTCGAGATATCTACTATAATTACGGA

GCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:41)
(pYL742)

Вариант H1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFGYYPDS
VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ
ID NO:42)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTCCGCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGATACTATCCAGACAGT
GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATGAAC
AGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTCGAGATATTTACTATAATTACGGA
GCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:43)
(pYL743)

Вариант H2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSSTIYYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO:44)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTCCGCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTAGTCCAGGAGACAGTAGCACTATCTACTATGCAGAC
AGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
AACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCCGAGATATTTACTATAATTAC
GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
NO:45) (pYL744)

Вариант H3

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFGYYYPD
SVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO:46)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGCGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTCCGCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGCTACTACTATCCAGAC

AGTGTGCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
AACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCAGATATTTACTATAATTAC
GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
NO:47) (pYL745)

Вариант H4

dVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWV**a**TISPGDSFGYYYPD
SVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**t**RDIIYNYGAWFAYWGQTLVTVSS
(SEQ ID NO:24)

GACGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGCGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTCGCCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGCTACTACTATCCAGAC
AGTGTCCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
AACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTATAATTAC
GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
NO:48) (pYL746)

Вариант H5

dVQLV**q**SGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWV**a**TISPGDSFGYYYPD
SVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**t**RDIIYNYGAWFAYWG**r**TLVTVSS
(SEQ ID NO:49)

GACGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGCGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTCGCCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGCTACTACTATCCAGAC
AGTGTCCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
AACAGGCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTATAATTAC
GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCAGAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
NO:50) (pYL747)

Вариант H6

dVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWV**a**TISgGnnyGYsYPD
SV**k**GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**t**RDIIYNYGAWFAYWGQTLVTVSS
(SEQ ID NO:52)

GACGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC

TGCGCAGCCTCTGGATTCACCTTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTCGCCAAGCACCGGGC
 AAGGGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGGCGGAAATAACTACGGCTACTCCTATCCAGAC
 AGTGTCAAGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
 AACTCCCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTATAATTAC
 GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
 NO:53) (pYL748)

Выравнивание аминокислотных последовательностей версий от
 H0 до H6 показано ниже:

```

H0 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVSAIS-GSGGSTY
H1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFG-Y
H2 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSSTIY
H3 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFGYY
H4 DVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVATISPGDSFGYY
H5 DVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVATISPGDSFGYY
H6 DVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSTYMSWVRQAPGKGLEWVATISGGNNYGS
   :****:*****:*****:*** *..

H0 YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:40)
H1 YPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:42)
H2 YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:44)
H3 YPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:46)
H4 YPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:24)
H5 YPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAYWGRGLVTVSS (SEQ ID NO:49)
H6 YPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:52)
   *.***:***** *****:*****:*****

```

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

Вариант L0

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS**TLES**GVPSRFSGSGSGTDFTLT**ISS**LQPEDFATYYC**QQS**NEDPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:54)

GCTATTCAGCTGACCCAATCTCCATCCTCTTTGTCCGCCTCTGTGGGGGACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAGGCTCCCAA**ACT**CCTCATCTACGCTGCATCCACTCTCGAGTCTGGGGTCCCATCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACAATCAGCTCACTCCAGCCAGAGGATTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGCAACGAGGATCCTCGGACGTTTCGGTCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAG (SEQ ID NO:55) (pYL729)

Вариант L1

dAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS**TLES**GVPSRFSGSGSGTDFTLT**ISS**LQPEDFATYYC**QQS**NEDPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:56)

GACATTCAGCTGACCCAATCTCCATCCTCTTTGTCCGCCTCTGTGGGGGACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAGGCTCCCAA**ACT**CCTCATCTACGCTGCATCCACTCTCGAGTCTGGGGTCCCATCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACAATCAGCTCACTCCAGCCAGAGGATTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGCAACGAGGATCCTCGGACGTTTCGGTCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAG (SEQ ID NO:57) (pYL730)

Вариант L2

dAIQLTQSPSSLS**v**SVGDR**a**TIT**s**CKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS**TLES**GVPSRFSGSGSGTDFTLT**ISS****v**QPEDFATYYC**QQS**NEDPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:58)

GACATTCAGCTGACCCAATCTCCATCCTCTTTGTCCGTCTCTGTGGGGGACAGGGCAACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAGGCTCCCAA**ACT**CCTCATCTACGCTGCATCCACTCTTGAGTCTGGGGTCCCATCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACAATCAGCTCAGTGCAGCCAGAGGATTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGCAACGAGGATCCTCGGACGTTTCGGTCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAG (SEQ ID NO:59) (pYL731)

Выравнивание аминокислотных последовательностей вариантов от L0 до L2 показано ниже:

```

L0 AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASTLES
L1 DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASTLES
L2 DIQLTQSPSSLSVSVGDRATISCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASTLES
  .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

L0 GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
L1 GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:56)
L2 GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSNEDPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:58)
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

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

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

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

Пример 5. Связывание Hx/L1 с BDCA2

Все возможные варианты (21 вариант) тяжелой и легкой цепи hu24F4 (как описано в примере 4) и ch24F4 были транзитивно экспрессированы в клетках 293Е путем котрансфекции плазмид тяжелой цепи и легкой цепи. Все варианты hu24F4 были собраны и

секретированы, с титрами, превышающими титры ch24F4 (что определяли по количеству мАт в кондиционированной среде путем ОСТЕТ-связывания с наконечниками с анти-человеческими Fc). Вестерн-блоттинг с анализами SDS-PAGE с невозстанавливающими условиями, выполненными с химерными и гуманизированными моноклональными антителами 24F4, не показал большой агрегации или очевидного клипирования по отношению к ch24F4.

Кондиционированную среду анализировали с помощью прямого связывания FACS на стабильно трансфицированных DG44 клетках CHO, которые коэкспрессировали полноразмерные кДНК BDCA2 и Fc8RIγ (человека или обезьяны циномолгус), подходящими векторами экспрессии были человеческий BDCA2/Fc8RIγ:pEAG2456, циномолгусный BDCA2/Fc8RIγ:pEAG2668). При прямом связывании с поверхностным BDCA2 человека или обезьяны циномолгус наблюдалась полная утрата связывания у вариантов H0, H1 и H2 hu24F4, значительная потеря аффинности связывания наблюдалась у варианта H3 hu24F4, хорошее сохранение аффинности выявлено в обоих вариантах H4 и H5 hu24F4, и умеренная потеря связывания выявлена в вариантах H6 hu24F4 (фиг.2 и 3). На основании титра и очевидных значений EC₅₀ в анализе прямого связывания FACS были определены H4/L1 и H5/L1 как "лучшие" варианты hu24F4.

Кондиционированную среду, содержащую ch24F4 и все варианты мАт hu24F4, анализировали с помощью ОСТЕТ на связывание с эктодоменом BDCA2 человека. Был изготовлен эктодомен мономерного huBDCA2 путем протеолитического расщепления из очищенного слитого белка muIgG2a FC-huBDCA2 (соответствующая плазмида: pEAG2423). Антитела из кондиционированной среды от транзитивно трансфицированных клеток связывали с наконечниками с анти-человеческими Fc, а затем мономерный huBDCA2 пропускали через ОСТЕТ-наконечники для анализа связывания и диссоциации. Серии H4 и H5 вариантов hu24F4 показали лучшую аффинность к huBDCA2.

Название образца	Аффинность связывания KD (М)	Скорость ассоциации k_{on} (1/МС)	Скорость диссоциации k_{dis} (1/С)
H6/L0	5,00E-09	2,73E+05	1,37E-03
H0/L1	9,50E-11	1,00E+05	9,50E-06
H1/L1	5,03E-11	1,00E+05	5,03E-06
H2/L1	3,35E-11	1,00E+05	3,35E-06
H3/L1	1,30E-08	4,52E+05	5,86E-03
H4/L1	7,44E-10	5,49E+05	4,08E-04
ch24F4	2,17E-09	1,61E+06	3,49E-03
Контроль 5C8	2,51E-14	1,00E+05	2,51E-09

Пример 6. Повышение аффинности hu24F4

Чтобы изучить возможность повышения аффинности hu24F4 путем замещения в положении CDR L3 версии L1 24F4 непарного цистеина (C95S в векторе экспрессии pYL740 легкой цепи hu24F4), был сконструирован ряд вариантов версии L1 путем сайт-направленного мутагенеза. Обратную мутацию в непарном цистеине, т.е. в S95C, конструировали с помощью сайт-направленного мутагенеза, продуцирующего плазмиду pYL749. Варианты S95T, S95A и S95V были сконструированы путем сайт-направленного мутагенеза, продуцирующего плазмиды pYL750, pYL751 и pYL752, соответственно. Полноразмерные кДНК-последовательности легкой цепи в полученных плазмидах были подтверждены секвенированием ДНК. Вариантные C95 моноклональные антитела hu24F4 были транзитивно экспрессированы в клетках 293Е путем котрансфекции pYL746 тяжелой цепи hu24F4 H4 или pYL747 тяжелой цепи hu24F4 H5 с hu24F4 L1 вариантами легких цепей из плазмид C95S pYL740, S95C pYL749, S95T pYL750, S95A pYL751 или S95V pYL752. Кондиционированную среду собирали через 2 дня после трансфекции. Титры (анализированные с помощью ОСТЕТ с наконечниками с анти-человеческими Fc) всех вариантов были сходными, и вестерн-блоттинг SDS-PAGE с невозстанавливающими

условиями не показал большой агрегации или очевидного клиппинга. Кондиционированную среду, содержащую варианты мАТ C95, анализировали способом ОСТЕТ на связывание с эктодоменом BDCA2 человека. Антитела из кондиционированной среды от транзиторно трансфицированных клеток связывали с наконечниками с анти-человеческими Fc, затем мономерный huBDCA2 пропускали через наконечники ОСТЕТ для анализа связывания и диссоциации. Варианты C95A имели самую низкую скорость диссоциации.

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

На основании этих результатов были созданы стабильные клеточные линии CHO для C95T и C95A вариантов hu24F4 H4/L1 и вариантов C95T и C95A H5/L1, которые имели самую низкую скорость диссоциации. Анализы связывания ОСТЕТ повторяли для очищенных моноклональных hu 24F4. В качестве ведущего кандидата выбрали C95A вариант hu 24F4 H4/L1. Последовательности плазмид pYL746 (тяжелой цепи hu 24F4 H4) и pYL751 (легкой цепи hu 24F4 L1) были использованы для перекодирования и конструирования экспрессирующих векторов для создания продуцирующей клеточной линии CHO.

Выведенная зрелая аминокислотная последовательность легкой

цепи hu24F4 L1 C95A, кодируемая pYL751, показана ниже (CDR L1, CDR L2 и CDR L3 подчеркнуты):

```

1  DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL
51  LIYAASTLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQANEDPR
101 TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTVSVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLISKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

```

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

```

1  DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS TYTMSWVRQA PGKGLEWVAT
51  ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGLTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT
201 QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
251 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
301 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
351 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
401 PVLDSGDGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
451 G (SEQ ID NO:4)

```

Антитело, состоящее из зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO:4) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO:3), показанных выше, называется ВІІВ059.

Пример 7. Перекодирование генов тяжелой и легкой цепи

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

```

1 atg gac atg agg gtc ccc gct cag etc ctg ggg etc ctt ctg etc tgg etc cct gga gca cga tgt
1> M D M R V P A Q L L G L L L L W L P G A R C

67 GAC ATT CAG CTG ACC CAA TCT CCA TCC TCT TTG TCC GCC TCT GTG GGG GAC AGG GTC ACC ATC ACC
23> D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T

133 TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA
45> C K A S Q S V D Y D G D S Y M N W Y Q Q K P

199 GGG AAG GCT CCC AAA CTC CTC ATC TAC GCT GCA TCC ACT CTC GAG TCT GGG GTC CCA TCC AGG TTT
67> G K A P K L L I Y A A S T L E S G V P S R F

265 AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACA ATC AGC TCA CTC CAG CCA GAG GAT TTC GCA
89> S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A

331 ACC TAT TAC TGT CAA CAA GCC AAC GAA GAT CCT CGG ACC TTC GGT CAG GGC ACC AAA GTG GAA ATC
111> T Y Y C Q Q A N E D P R T F G Q G T K V E I

397 AAG CGG ACC GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCT CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA
133> K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G

463 ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTG CAG TGG AAG GTG
155> T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V

529 GAT AAC GCC CTC CAA TCT GGC AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC
177> D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T

595 TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC
199> Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Пример 8. Кассеты и векторы экспрессии

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

Плазмида, экспрессирующая легкую цепь, rJP009, также содержит кассету экспрессии для гена неомycin-фосфотрансферазы (neo), и содержит ранний промотор мышинной фосфоглицераткиназы (muPGK) и последовательность полиаденилирования muPGK (фиг.4). Плазмида, экспрессирующая тяжелую цепь, rJP010, также содержит кассету экспрессии для гена dhfr, который был использован в

качестве селектируемого и амплифицируемого с метотрексатом маркера. Ключевые свойства плазмид pJP009 и pJP010 приведены ниже.

Название плазмиды	Промоторы	Сигнальные пептиды	Зрелая полипептидная цепь	Полиаденирован	Селектируемые маркеры
pJP009	hCMV IE muPGK	Нативный человеческий подгруппа I каппа	Легкая цепь 218 аминокислот	hGH muPGK	неомицин-фосфотрансфераза: (G418) бета-лактамаза: (ампициллин)
pJP010	hCMV IE SV40E	Синтетическая последовательность в сигнального пептида	Тяжелая цепь 451 аминокислота	hGH SV40E	DHFR: (альфа-нуклеозиды) бета-лактамаза: (ампициллин)

Сокращения: немедленно-ранний цитомегаловирус человека (hCMV IE), ранний обезьяний вирус 40 (SV40E), мышьяная фосфоглицераткиназа (muPGK), человеческий гормон роста (hGH), ген неомицин-фосфотрансферазы (G418 resistance), ген дигидрофолатредуктазы (dhfr), бактериальный ген устойчивости к ампициллину (бета-лактамаза).

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

```

1  TTGACATTGATTATTGACATAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTA
93  CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
185  TTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAATGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
277  CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA
369  TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT
461  GACGTCATGGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAG
553  GCGTGATCGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATA
645  GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTAT
737  AGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGTATAGTGTGTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCTCTATGTTATAGGT
829  GATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTATTGACCATTTATGACCACTCCCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACA
921  TGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTACAGGATGGGGT

```

1013 CTCATTTATTATTTACAAATTCACATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAAT
 1105 CTCGGGTACGTGTTCCGGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGGCCACCAGACATAATAGCTGACAGA
 1197 CTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCCTTGACACGGGATCCGCCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC
 > M D M R V P
 1281 GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTT CTG CTC TGG CTC CCT GGA GCA CGA TGT GAC ATT CAG CTG ACC CAA TCT
 > A Q L L G L L L L W L P G A R C D I Q L T Q S
 1350 CCA TCC TCT TTG TCC GCC TCT GTG GGG GAC AGG GTC ACC ATC ACC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT
 > P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D
 1419 TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGG AAG GCT CCC AAA CTC CTC ATC TAC
 > Y D G D S Y M N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y
 1488 GCT GCA TCC ACT CTC GAG TCT GGG GTC CCA TCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
 > A A S T L E S G V P S R F S G S G S G T D F T
 1557 CTC ACA ATC AGC TCA CTC CAG CCA GAG GAT TTC GCA ACC TAT TAC TGT CAA CAA GCC AAC GAA GAT CCT
 > L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N E D P
 1626 CGG ACC TTC GGT CAG GGC ACC AAA GTG GAA ATC AAG CGG ACC GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC
 > R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F
 1695 CCT CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC
 > P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
 1764 AGA GAG GCC AAA GTG CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCT GGC AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA
 > R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
 1833 GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG
 > E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 1902 AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCT CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC
 > K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N
 1971 AGG GGA GAG TGT TGA GGATCCCTGCCCGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAGTGCCTCTCCTGGTCTGGAAGGTGCTACTCCA
 > R G E C • (SEQ ID NO:64)
 2058 GTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTGTTGACTAGGTGTCCTTGTATAATATTATGGGGTGGAGGCGGGTGGT
 2150 ATGGAGCAAGGGGCAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTTCAGGGTCTATTGGGAACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCATCTTGGCTCG
 2242 CTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGTCTCCCGAATAGTTGGGATTCCAGGCATGCACGACCAGGCTCAGCTAA
 2334 TTTTGTATTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGTCTGGTCTCCATCTCCTGACCTCAGGTAATCCGCCCGCCTCGGCCTCC
 2426 CAAATTGCTGGGATTACAGGTATGAGCCACTGGGGCCCTCCCTGTCTGTGATTTTAAATAATTATACCAGCAGAAGGACGTCCAGACACA
 2518 GCATGGGCTACCTGGCCATGCCAGCCAGTTGGACATTTGAGTTGTTTCTTGGCACTGTCCTCTCATGAATTCCTGCAGGATTCGAGGGCC
 2610 CCTGCAGGTCAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTA
 2702 CACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTTCGCGCCACCTTCTA
 2794 CTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCCCGCCGAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTG

2886 CAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAG
 2978 GCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGTCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCA
 3070 CGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCTCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCCATTGAACA
 > M G S A I E Q
 3162 AGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCG
 > D G L H A G S P A A W V E R L F G Y D W A Q Q T I G C S D A
 3254 CCGTGTTCCGGCTGTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCG
 > A V F R L S A Q G R P V L F V K T D L S G A L N E L Q D E A A
 3346 CGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTTCGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGTATTGGGCGA
 > R L S W L A T T G V P C A A V L D V V T E A G R D W L L L G E
 3438 AGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTG
 > V P G Q D L L S S H L A P A E K V S I M A D A M R R L H T L
 3530 ATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTCCGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGAT
 > D P A T C P F D H Q A K H R I E R A R T R M E A G L V D Q D D
 3622 CTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTCGTGACCCA
 > L D E E H Q G L A P A E L F A R L K A R M P D G D D L V V T H
 3714 TGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATC
 > G D A C L P N I M V E N G R F S G F I D C G R L G V A D R Y
 3806 AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC
 > Q D I A L A T R D I A E E L G G E W A D R F L V L Y G I A A P
 3898 GATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTTCGACGAGTTCTTCTGAGGGGATCGATCCGCTGTAAGTCTGCAGAAATTGATGATCTATTA
 > D S Q R I A F Y R L L D E F F • (SEQ ID NO:65)
 3990 AACAAATAAAGATGTCCACTAAAATGGAAGTTTTTCTGTCTACTTTTGTAAAGAAGGGTGAGAACAAGAGTACCTACATTTTGAATGGAAGGA
 4082 TTGGAGCTACGGGGGTGGGGTGGGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCTTTACTGAAGGCTCTTTACTATTGCTTTATGATAATGTTTCAT
 4174 AGTTGGATATCATAATTTAAACAAGCAAAACCAAATTAAGGGCCAGCTCATTCCTCCCACTCATGATCTATAGATCTATAGATCTCTCGTGG
 4266 GATCATTTGTTTTTCTCTTGATTCCCACTTTGTGTTTCTAAGTACTGTGGTTTCCAAATGTGTCACTTTTCATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC
 4358 AGCCTCTGTTCCACATACACTTCATTCTCAGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCATCAGAAGCTGACTCTAGATCTGGATCGATGAATTC
 4450 GGGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCA
 4542 TAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGAC
 4634 CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCCGTATCACCAGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGG
 4726 TTAATGTCATGATAAATATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCTAAATA
 4818 CATTCAAATATGTATCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCG
 > M S I Q H F R
 4910 TGTGCCCCTTATTCCTTTTTTGGGGCATTTTGCTTCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGT
 > V A L I P F F A A F C L P V F A H P E T L V K V K D A E D Q

```

5002 TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGC
    >L G A R V G Y I E L D L N S G K I L E S F R P E E R F P M M S
5094 ACTTTTAAAGTTCTGTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGA
    > T F K V L L C G A V L S R I D A G Q E Q L G R R I H Y S Q N D
5186 CTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATA
    > L V E Y S P V T E K H L T D G M T V R E L C S A A I T M S D
5278 ACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT
    >N T A A N L L L T T I G G P K E L T A F L H N M G D H V T R L
5370 GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
    > D R W E P E L N E A I P N D E R D T T M P V A M A T T L R K L
5462 ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG
    > L T G E L L T L A S R Q Q L I D W M E A D K V A G P L L R S
5554 CCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG
    >A L P A G W F I A D K S G A G E R G S R G I I A A L G P D G K
5646 CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT
    > P S R I V V I Y T T G S Q A T M D E R N R Q I A E I G A S L I
5738 TAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGA
    > K H W • (SEQ ID NO:66)
5830 TCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
5922 TGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACACGCGGTGGTTTGTGTTGCGCGATCAAGAGCTACC
6014 AACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGA
6106 ACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAC
6198 TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
6290 ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGSTAAGCGGCAGGGTCGGAA
6382 CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGCTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTT
6474 TTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA
6566 CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCGAGCCGAACGACCG
6658 AGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCTGG
6750 CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTT
6842 TATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC

```

(SEQ ID NO:67)

Полная нуклеотидная последовательность плазмиды pJP010 (фиг.5) показана ниже. Три открытые рамки считывания представляют собой тяжелую цепь 24F4, мышиную дигидрофолатредуктазу и бета-лактамазу.

1 TTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTA
 93 CGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
 185 TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
 277 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA
 369 TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCAT
 461 GACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTTCCAAATGTCTGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAG
 553 GCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATA
 645 GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCTAT
 737 AGAGTCTATAGGCCCAACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCTCATGTTATAGGT
 829 GATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTATTGACCATTATTGACCACTCCCCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACA
 921 TGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCTTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTACAGGATGGGGT
 1013 CTCATTTATTATTACAAATTCACATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAAT
 1105 CTCGGGTACGTGTTCCGGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGA
 1197 CTAACAGACTGTTCCCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCTTGACACGGGATCCGCCACC ATG GGT TGG AGC CTC ATC
 > M G W S L I
 1281 TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACC CGG GTC CTG TCC GAC GTC CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC
 > L L F L V A V A T R V L S D V Q L V E S G G G
 1350 CTG GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGC GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT ACC TAT ACC
 > L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S T Y T
 1419 ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCA CCT GGC AAG GGA CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT CCA GGA GAC AGT
 > M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S P G D S
 1488 TTC GGC TAC TAC TAT CCA GAC AGT GTC CAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AGT
 > F G Y Y Y P D S V Q G R F T I S R D N A K N S
 1557 CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGG GCA GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC CGA GAT ATT TAC
 > L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D I Y
 1626 TAT AAT TAC GGA GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT AGC GCT TCC ACC
 > Y N Y G A W F A Y W G Q G T L V T V S S A S T
 1695 AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCT GCC CTG GGC
 > K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
 1764 TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC
 > C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
 1833 GTG CAC ACC TTC CCC GCT GTC CTG CAA TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC TCC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
 > V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 1902 TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
 > S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
 1971 AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAG ACT CAC ACA TGC CCA CCT TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
 > K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L

2040 GGG GGA CCT TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG
 > G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
 2109 GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAT GTT GAC GGC
 > V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
 2178 GTG GAG GTC CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCT CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACC TAC CGG GTG GTC AGC
 > V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
 2247 GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAA GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC
 > V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A
 2316 CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
 > L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T
 2385 CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAA GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
 > L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 2454 CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCT GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACA CCT CCC
 > P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
 2523 GTG TTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC TCC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG
 > V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
 2592 GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTC TCC
 > G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
 2661 CTG TCT CCC GGT TGA GGATCCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGTCTGGAAGGTGCTACTCCA
 > L S P G • (SEQ ID NO:68)
 2748 GTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTGTTGACTAGGTGTCCTTGTATAATATTATGGGGTGGAGGCGGGTGGT
 2840 ATGGAGCAAGGGGCAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTTCAGGGTCTATTGGGAACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTTGGCTCG
 2932 CTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGTCTCCCGAATAGTTGGGATTCCAGGCATGCACGACCAGGCTCAGCTAA
 3024 TTTTGTATTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGTCTGGTCTCCATCTCCTGACCTCAGGTAATCCGCCCCCTCGGCCTCC
 3116 CAAATTGCTGGGATTACAGGTATGAGCCACTGGGCCCTTCCCTGTCTGTGATTTTAAAATAATTATACCAGCAGAAGGACGTCCAGACACA
 3208 GCATGGGCTACCTGGCCATGCCAGCCAGTTGGACATTTGAGTTGTTGCTTGGCACTGTCCTCTCATGAATTCGTCGACAGATCTGCGCAG
 3300 CACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTGAGTTAGGG
 3392 TGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTC
 3484 CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGC
 3576 CCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG
 3668 TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGATTCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTC
 3760 GTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGC
 3852 GTTCTGTATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGC
 3944 TAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCATGGTTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAA
 > M V R P L N C I V A V S Q N M G I G K N

4036 CGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGG
 > G D L P W P P L R N E F K Y F Q R M T T T S S V E G K Q N L
 4128 TGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTCGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAA
 >V I M G R K T W F S I P E K N R P L K D R I N I V L S R E L K
 4220 GAACCACCACGAGGAGCTCATTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACAT
 > E P P R G A H F L A K S L D D A L R L I E Q P E L A S K V D M
 4312 GGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAAT
 > V W I V G G S S V Y Q E A M N Q P G H L R L F V T R I M Q E
 4404 TTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGAAATATAAACTTCTCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAA
 >F E S D T F F P E I D L G K Y K L L P E Y P G V L S E V Q E E
 4496 AAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACTCGAGAATTACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGCGGCCGG
 > K G I K Y K F E V Y E K K D • (SEQ ID NO:69)
 4588 CCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTG
 4680 TGATGCTATTGCTTTTATTTGTAAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGG
 4772 AGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAAGGATCTGTGACGAATTCAGTGGCCGCTCGTTTTA
 4864 CAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCCGACGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
 4956 CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTT
 5048 CACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACCCGCTGACGCGCCC
 5140 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTTTTTACCCTCATCACC
 5232 GAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT
 5324 TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATG
 5416 CTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTGTTT
 > M S I Q H F R V A L I P F F A A F C L P V F
 5508 TGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTA
 > A H P E T L V K V K D A E D Q L G A R V G Y I E L D L N S G
 5600 AGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC
 >K I L E S F R P E E R F P M M S T F K V L L C G A V L S R I D
 5692 GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGG
 > A G Q E Q L G R R I H Y S Q N D L V E Y S P V T E K H L T D G
 5784 CATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG
 > M T V R E L C S A A I T M S D N T A A N L L L T T I G G P K
 5876 AGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAG
 >E L T A F L H N M G D H V T R L D R W E P E L N E A I P N D E
 5968 CGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
 > R D T T M P V A M A T T L R K L L T G E L L T L A S R Q Q L I

```

6060 AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
    > D W M E A D K V A G P L L R S A L P A G W F I A D K S G A G
6152 AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACT
    > E R G S R G I I A A L G P D G K P S R I V V I Y T T G S Q A T
6244 ATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTA
    > M D E R N R Q I A E I G A S L I K H W • (SEQ ID NO:70 )
6336 GATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTT
6428 CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAA
6520 AAACCAACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACC
6612 AAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
6704 CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACG
6796 GGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC
6888 CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGCTATC
6980 TTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGC
7072 AACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCAGATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT
7164 TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
7256 GCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGACAGTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCA
7348 ATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
7440 ATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC (SEQ ID NO:71)

```

Пример 9. Конструирование клеточной линии

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

Плазмиды рJP009 и рJP010, экспрессирующие перекодированную легкую цепь и тяжелую цепь анти-BDCA2, соответственно, были трансфицированы в клетки-хозяина этой линии путем электропорации. Селекцию трансфицированных клеток, экспрессирующих dhfr, проводили с использованием среды с дефицитом G нуклеозидов. После селекции в среде aMEM с дефицитом нуклеозидов, описанной выше, трансфицированный пул обогащали высокоэкспрессирующими клеточными линиями, используя комбинацию сортировки клеток с активацией флуоресценции и

инструмент Genetix Clonepix FL (CER-00-09-03). Клеточные колонии, выделенные на ClonePix FL, собирали из полутвердой среды в 96-луночные планшеты. В отдельных лунках клетки размножали и оценивали их продуктивность. Клеточная линия, которая показала самый высокий титр в анализе при встряхивании во флаконе с подпиткой (# 49), переводили в Research Animal Fermentation для роста в 10-литровом биореакторе в целях получения материала для определения его свойств.

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

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

Пример 10. Посттрансляционные модификации антитела против BDCA2, BIIIB059

а) Окисление

Эндо-Lys C пептидное картирование антитела против BDCA2 BIIIB059 показало, что Met-257, Met-433 и Trp-163 тяжелой цепи являются сайтами, восприимчивыми к окислению. Уровни варьировались в диапазоне от 4 до 7%. Экспериментальные данные указывают на то, что в основном окисление связано с приготовлением образца.

b) Деаминация

Эндо-Lys C пептидное картирование антитела против BDCA2 ВІІВ059 показало, что примерно 2,5% каждого из Asn-389, Asn-394 и Asn-395 в тяжелой цепи было деаминировано (комбинированное деаминация и образование сукцинимидов), и примерно 2,5% из Asn-320 в тяжелой цепи было деаминировано (в форме сукцинимидов). Общее количество сукцинимидных форм для Asp-32 и Asp-34 в легкой цепи составляло примерно 3%. Комбинированная изомеризация Asp-32 и Asp-34 в легкой цепи составляла примерно 5%. Подобно окислению, некоторые из этих модификаций могут быть связаны с приготовлением образца.

с) Гликация

Гликация представляет собой неферментативную модификацию, вызванную реакцией аминокислот на белки с глюкозой, являющиеся компонентом культуральной среды. Гликация обычно обнаруживается в белках, и ее уровень широко варьируется в зависимости от условий культивирования клеток. В антителе ВІІВ059 уровень гликации, измеренный с помощью интактного масс-анализа нередуцированного белка, составлял примерно 10%. Анализ пептидного картирования показал примерно 0,46% гликации на Lys-107 в легкой цепи, примерно 0,28% на Lys-103 в легкой цепи и примерно 0,2% на Lys-295 в тяжелой цепи.

d) O-связанное гликозилирование

Не было выявлено O-связанное гликозилирование ВІІВ059.

e) Другие модификации (например, гидроксизин и т.д.)

Анализ показал, что <1% тяжелой цепи антитела ВІІВ059 находится в α-гликозилированной форме. В анализе не выявлено замен Asn на Ser, и в антителе не было обнаружено неизвестных модификаций или мутаций на уровне ≥1%.

Пример 11. Прямое связывание ВІІВ059 с клеточной поверхностью плазмоцитоидных дендритных клеток

Анализ цельной крови способом проточной цитометрии был разработан для оценки связывания ВІІВ059 с BDCA2 на плазмоцитоидных дендритных клетках (pDC) человека или обезьян циномолтус. Периферическую кровь обезьян циномолтус (Toxikon, Inc, Bedford, MA) или человеческую периферическую кровь (Biogen

Idec) собирали в пробирки для образцов с гепарином-натрием и оставляли при комнатной температуре. Коктейль антител для FACS-окрашивания в целях выявления клеток pDC добавляли в каждую аликвоту всей крови, включающей в себя антитела CD20, CD14, CD123 и HLA-DR. Меченое Alexa647 антитело B1B059 (Biogen Idec, Lot # 17073-057) или меченый Alexa647 контрольный изотип hlgG добавляли в окрашивающий коктейль FACS в концентрации от 0 до 40 мкг/мл. Кровь инкубировали на льду в условиях защиты от света, в течение 30 минут. Через 30 минут каждую аликвоту цельной крови 500 мкл (циномолгус) или 100 мкл (человека) обрабатывали буфером IX Easy Lyse (Leinco Technologies) в количестве 10 мл (для крови цинномолгусов) или 2 мл (для крови человека) которые инкубировали при 37°C в течение не менее одного часа. После инкубации в течение 10-15 минут при комнатной температуре образцы центрифугировали при 1400 оборотах в минуту в течение 5 минут. Супернатант декантировали, оставляя только осадок лейкоцитов (WBC). Каждый осадок WBC промывали 5 мл FACS буфера (1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) + 0,002% NaAzide + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂ в ФБР) и центрифугировали при 1400 оборотах в минуту в течение 5 минут. Супернатант декантировали, каждый осадок WBC ресуспендировали в 200 мкл FACS буфера и переносили в 96-луночный круглодонный планшет (Fisher Scientific). Планшет центрифугировали при 1400 оборотах в минуту в течение 5 минут. Супернатант вытряхивали из планшета, и каждый осадок WBC промывали 200 мкл FACS буфера. Планшет центрифугировали при 1400 оборотах в минуту в течение 5 минут, затем супернатант вытряхивали из планшета. После промывания (как описано выше), лейкоциты ресуспендировали в 200 мкл 1% параформальдегида (PFA) в ФБР и фиксировали при 4°C в течение ночи в защищенном от света месте.

Непосредственно перед анализом проточной цитометрии лейкоциты фильтровали с использованием фильтровального нейлонового сетчатого планшета калибром 60 микрон (Millipore). Затем каждый осадок переносили в новый 96-луночный круглодонный планшет и центрифугировали при 1400 оборотах в минуту в течение

5 минут. Каждый осадок лейкоцитов ресуспендировали в 250 буфера FACS и измеряли интенсивность флуоресценции на устройстве LSRII для 4-цветной FACS. Одноцветную компенсацию получали с помощью набора компенсационных частиц анти-мышинного Ig (Compensation Particle beads set, BD Biosciences). Анализ проводили с использованием программного обеспечения FlowJo и GraphPad Prism. Связывание ВІІВ059 с клетками обезьян циномолтус и человеческими клетками было одинаковым при значении EC_{50} 1-2 мкг/мл (7-13 нМ) (фиг.6).

Пример 12. Оценка самоассоциации ВІІВ059

AlphaScreen анализ представляет собой гомогенный тест близости с использованием глутатионовых донорных и акцепторных шариков (Perkin Elmer) для связывания человеческого FcRIIa (CD32a) GST. В эту смесь добавляли различные концентрации антител, предназначенных для тестирования. Поскольку связывание антитела с FcRIIa является одновалентным, единственным способом генерирования сигнала является наличие и у донорных и у акцепторных шариков связанного антитела, которое затем ассоциируется, таким образом, что шарики локализуются в пределах 200 нм, тем самым создается возможность продуцировать синглетный кислород и, следовательно, происходит эмиссия света. Уровень эмиссии, обнаруживаемой с помощью оборудования Envision (Perkin Elmer), пропорционален степени самоассоциации.

Фиг.7 показывает результаты AlphaScreen для ВІІВ059 по сравнению с 5с8 (отрицательный контроль) и LT105 (положительный контроль с сильной самоассоциацией).

Пример 13. Оценка неспецифического связывания ВІІВ059

Хроматография перекрестного взаимодействия (CIC) представляет собой высокопропускной способ для предварительной оценки липкости кандидатов мАТ (Jacobs et al, Pharm Res., 27(1): 65-71 (2010)). В этом способе массу из человеческих поликлональных IgG химически соединяли с NHS-активированной хроматографической смолой. После этого сравнивали время удерживания ВІІВ059 на недериватизированной и IgG-дериватизированной колонках с контрольной группой мАТ с хорошими показателями и мАТ с плохими показателями. С помощью

этого способа у ВІІВ059 не было выявлено каких-либо признаков неспецифичного связывания, что свидетельствует о его низких значениях времени удерживания и K' .

Данные СІС, показывающие растворимость и неспецифичное связывание

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

← более высокие значения K' может быть показателем

← более низкая растворимость

Пример 14. Оценка стабильности ВІІВ059

Дифференциальную сканирующую флуориметрию применяли для тестирования стабильности ВІІВ059 в диапазоне условий, связанных с буфером для исходной исследовательской композиции. Разворачивание белка контролировали с помощью системы ПЦР в реальном времени Mx3005p (Agilent Technologies) в 96-луночном формате с использованием 10 мкг белка в 50 мкл ФБР (pH 7,0) с добавлением оранжевого флуорофора Sypro в конечной концентрации 10X (исходя из стокового указания 1000X от Invitrogen). Образцы нагревали на 1°C в минуту от 25°C до 95°C с измерением интенсивности флуоресценции по три раза на каждый 1°C. Выстраивали диаграмму интенсивности флуоресценции в зависимости

от температуры. Из этих кривых получали значение T_m , вводя отрицательное производное (" $-R'(T)$ " в программу Mx3005p) и выбирая локальные минимумы из диаграмм производных. Использовали базовый буфер 20 мМ цитрата натрия, уровень pH варьировался от 5,0 до 7,5, и концентрации NaCl и сахарозы варьировались от 50 до 250 мМ.

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

Пример 15. Оценка стабильности ВІІВ059 при встряхивании

Раствор мАт ВІІВ059 в объеме 0,2 мл в 1 мг/мл 20 мМ цитрата натрия, pH 6,0, 150 мМ NaCl, подвергали реципрокному встряхиванию при комнатной температуре в 2 мл стеклянных флаконах (Waters, WAT270946C) с использованием титровального планшетного шейкера модели 4626 (Lab-Line Instruments, Titer Plate Shaker) при 600 оборотов в минуту. Аггрегацию оценивали путем мониторинга увеличения мутности при 320 нм с использованием спектрофотометра Beckman DU640. Обнаружено, что ВІІВ059 проявляет агрегацию в зависимости от времени. Обычно антитела человеческого IgG1 дикого типа не подвержены агрегации в таких условиях встряхивания. Как показано на фиг.9, агрегация полностью подавлялась путем добавления 0,03% Твин 80, обычного наполнителя для композиции. Аггрегация, индуцируемая встряхиванием, иногда может сильно зависеть от уровня pH. А-гликозилированные IgG4/IgG1 показывали более быструю и более обширную агрегацию, чем ВІІВ059. Аггрегация а-гликозилированных IgG4/IgG1 также подавляется путем добавления Твин 80.

Пример 16. Оценка вязкости ВІІВ059

Стабильность и вязкость образцов ВІІВ059 измеряли при высоких концентрациях 150 мг/мл и больше, чтобы способствовать потенциальной разработке продукта для подкожного введения.

Растворы ВІІВ059 центрифугировали в пробирках ультра-концентратора для ограничения полученных объемов и концентраций, что определяли УФ-сканированием. Стабильность определяли с помощью эксклюзионной хроматографии после хранения при 2–8°C в течение одной и двух недель. Концентрации белка, превышающие 200 мг/мл, легко достигались при небольших количествах белка в буфере 20 мМ цитрата, pH 6, 150 мМ NaCl, и агрегация оставалась низкой (0,68%) после двух недель хранения при температуре 2–8°C. Вязкость измеряли с использованием прибора Viscopros2000 (Cambridge Viscosity). Вязкость при 150 мг/мл составляла только 8 сП в цитратно-солевом буфере. Эти результаты показывают, что возможно получение высококонцентрированной композиции ВІІВ059.

Пример 17. Клонирование гена BDCA2 человека

Полноразмерную человеческую кДНК BDCA2 (huBDCA2) субклонировали в клонирующий вектор Invitrogen pCR4TOPO от Open Biosystems: эта плаزمида имеет обозначение pEAG2367. Секвенирование ДНК подтверждало, что эта кДНК была идентична полноразмерной кДНК BDCA2 человека в референс-банке Genbank под номером доступа NM_130441. Ниже показана полноразмерная открытая рамка считывания HuBDCA2, кодируемая pEAG2420, в которой подчеркнут ТМ-НММ-предсказанный трансмембранный домен:

```

1  MVEEEEPQDR EKGLWWFQLK VWSMAVVSIL LLSVCFTVSS VVPHNFMYSK
51  TVKRLSKLRE YQQYHPSLTC VMEGKDIEDW SCCPTPWTSF QSSCYFISTG
101 MQSWTKSQKN CSVMGADLVV INTREEQDFI IQNLKRNSSY FLGLSDPGGR
151 RHWQWVDQTP YNENVTFWHS GEPNNLDERC AIINFRSSEE WGWNDIHCHV
201 PQKSICKMKK IYI* (SEQ ID NO:1)

```

Ниже показана полноразмерная открытая рамка считывания HuFcεRIγ, кодируемая pEAG2413, которая идентична эталонной последовательности под номером в Genbank NP_004097:

```

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

```

Вектор экспрессии CHO, коэкспрессирующий кДНК и BDCA2 человека и FcεRIγ в tandemных транскрипционных единицах, был

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

Пример 18. Клонирование гена BDCA2 обезьян циномолгус и резус

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

```

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

```

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

```

1  M V P E E E P Q D R E K G L W W F Q L K V W S M A V V S I L L L S V C F T V S S V P H N F M Y S K 50
  |||||
1  M V P E E E P Q D R E K G V W W F Q L K V W S V A V V S I L L L C V C F T V S S V A S H N F M Y S K 50
  |||||
51 TVKRLSKLREYQQYHPSLTCTVMEGKDIEDWSCCPTPWTSFQSSCYFISTG 100
  |||||
51 TVKRLSKLQEQYQQYPSLTCTVMEGKDMEDWSCCPTPWTSFQSSCYFISTV 100
  |||||
101 MQSWTKSQKNCEVVGADLVVINTREEQDFIIQNLKRNSSYFLGLSDPGGR 150
  |||||
101 MQSWTKSQNNCEVVGADLVVINTKEEQDFITQNLKINSAYFLGLSDPKGW 150
  |||||
151 RHWQWVDQTPYNEKFWHSGEPNNLDERCAIINFRSSEEWGWNDIHCHV 200
  |||||
151 RHWQWVDQTPYNKFWHSGEPNSPDERCAIINFR.SSEEWGWNDVHCHV 199
  |||||
201 PQKSICKMKKIYI* 214 (SEQ ID NO:1)
  |||||
200 PQKSICKMKKIYI* 213 (SEQ ID NO:72)
  |||||

```

Ниже показана консенсусная открытая рамка считывания FcεRIγ обезьян циномолгус:

```

1  MIPAVVLLLLL LLVEQAAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
51  RKAASIASYEK SDGVYTGLST RNQETYETLK HEKPPQ (SEQ ID NO:73)

```

Последовательность кДНК FcεRIγ обезьян циномолгус идеально совпадает с предсказанной последовательностью кДНК резусов (исходя из короткого считывания генома), описанной в GenBank, номер доступа XM_001115585, и последовательностью обезьян циномолгус, депонированной учеными Genentech в GenBank, номер AF485816. Последовательность белка FcεRIγ обезьян циномолгус имеет 98,9% идентичности с человеческим белком FcεRIγ, и отличается только единственной консервативной заменой. Ниже представлено выравнивание между человеческой (сверху) и последовательностью обезьян циномолгус (снизу) FcεRIγ:

```

1  MIPAVVLLLLLLVEQAAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV 50
  |||||
1  MIPAVVLLLLLLVEQAAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV 50
  |||||
51 RKAASITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ* 87 (SEQ ID NO:2)
  |||||
51 RKAASIASYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ* 87 (SEQ ID NO:73)
  |||||

```

Вектор экспрессии CHO, коэкспрессирующий кДНК формы E73 SNP из BDCA2 обезьян циномолгус и кДНК FcεRIγ в tandemных

транскрипционных единицах, был сконструирован путем субклонирования фрагмента SpeI 2,11 кб из pCN652 в линейаризованный фосфатизированный векторный каркас SpeI 6,72 кб из pCN654, в результате чего получен "унивектор", обозначенный как pEAG2668. кДНК BDCA2 и FcεRIγ обезьян циномолгус в pEAG2668 имели подтвержденные последовательности. Стабильная клеточная линия CHO, стабильно коэкспрессирующая кДНК BDCA2 и FcεRIγ, была получена путем трансфекции с pEAG2668.

Пример 19. Перекрестная реактивность между BDCA2 человека и обезьян циномолгус

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

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

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

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

BDCA2 представляет собой мембранный белок типа II (С-конец находится за пределами клетки), конструирование растворимых слитых белков Fc включает добавление С-концевого эктодомена BDCA2 (остатки 45-213 для BDCA2 человека) к С-концу сконструированных Fc из IgG, при этом секрция запускалась мышиной внутри-рамочной сигнальной каппа последовательностью легкой цепи. Конструкцию pEAG2367 полноразмерного huBDCA2 использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 5' CAG TGT CTG TTT CAC TCC CGG GGG TGG CGG TGG TAG CAA TTT TAT GTA TAG C 3' (SEQ ID NO:74) (для добавления 5' XmaI (Pro-Gly) и немедленно-ранним линкером Gly4Ser перед 5'-концом эктодомена huBDCA2), и 5' CCA GGG AGA ATA GGA TCC TTA TAT GTA GAT CTT 3' (SEQ ID NO:75) (для добавления сайта 3' BamHI сразу после терминаторной huBDCA2). ПЦР-продукт 0,56 кб очищали и субклонировали в клонирующий вектор pCRBlunt11TOPO Invitrogen, получая pEAG2417, в котором вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Фрагмент 0,53 кб XmaI-BamHI из pEAG2417 и фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1397 (несущий сконструированные hulgG1 Fc, секрция которых запускалась внутри-рамочной сконструированной мышиной сигнальной каппа последовательностью легкой цепи) лигировали с каркасными векторными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, с получением вектора экспрессии pEAG2421 слитого белка hulgG1 Fc-huBDCA2, в котором вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Выведенная открытая рамка считывания, кодируемая pEAG2421, показана ниже:

1 MKLPVRLVL MFWIPASSSE PKSSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK

```

51 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP
201 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQOGNVFSCS VMHEALHNNH TQKSLSLSPG
251 GGGGSNFMYS KTVKRLSKLR EYQQYHPSLT CVMEGKDIED WSCCPTPWS
301 FQSSCYFIST GMQSWTKSQK NCSVMGADLV VINTREEQDF IIQNLKRNS
351 YFLGLSDPGG RRHWQWVDQT PYNENVTFWH SGEPNNLDER CAIINFRSSE
401 EWGWNDIHCH VPQKSICKMK KIIYI* (SEQ ID NO:76)

```

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

человеческая Fc IgG1: остатки 20-250, смотрите выше;

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

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

Для конструирования вектора экспрессии для слитого белка muIgG2a Fc-huBDCA2, фрагмент 0,53 кб XmaI-BamHI из pEAG2417 и фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1442 (несущий сконструированные мышинные IgG2a Fc, секрция которых запускается внутрирамочными сконструированными мышинными сигнальными каппа последовательностями легкой цепи) лигировали с векторными каркасными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, с получением pEAG2423, для которого вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Выведенная открытая рамка считывания, кодируемая pEAG2423, показана ниже:

```

1 MKLPVRLVL MFWIPASSSE PRGPTIKPSP PCKCPAPNLL GGPSVFIFPP
51 KIKDVLMI SL SPIVTCVVVD VSEDDPDVQI SWFVNNVEVH TAQTQTHRED
101 YNSTLRV VSA LPIQH QDWMS GKEFKCKVNN KDLPAPIERT ISKPKG SVRA
151 PQVYVLP PPE EEMTKKQVTL TCMVTDFMPE DIYVEWTNNG KTELNYK NTE
201 PVLDSDG SYF MYSKLRVEKK NWVERNSYSC SVVHEGLHNN HTTKSFS RTP
251 GGGGGSNFMYS SKTVKRLSKL REYQQYHPSL TCVMEGKDIE DWSCCPTPWT
301 SFQSSCYFIS TGMQSWTKSQ KNCSVMGADL VVINTREEQD FIIQNLKRNS
351 SYFLGLSDPG GRRHWQWVDQ TPYNENVTFW HSGEPNNLDE RCAIINFRSS
401 EEGWNDIHC HVPQKSICKM KIIYI* (SEQ ID NO:77)

```

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

мышинная Fc IgG1: остатки 20-251, смотрите выше;

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

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

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

Для конструирования BDCA2 обезьян циномолгус (сuno-BDCA2) в целях получения слитого белка Fc, полноразмерные E73 SNP варианты из cuno-BDCA2 в конструкции pCN648 подвергали сайт-направленному мутагенезу с праймерами 5' CTC TGT GTC TGT TTC ACT CCC GGG GGT GGC GGT GGT AGC AAT TTT ATG TAT AGC 3' (SEQ ID NO:78) и его обратным комплементом, для добавления линкера 5' XmaI (Pro-Gly) и Gly4Ser непосредственно перед 5'-концом эктодомена huBDCA2, с получением конструкции pEAG2675, для которой вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Для конструирования вектора экспрессии для слитого белка muIgG2a Fc-cuno BDCA2, фрагмент 0,53 кб XmaI-BamHI из pEAG2675 и фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1442 (несущий сконструированные мышинные IgG2a Fc, секрция которых запускается внутрирамочными сконструированными мышинными сигнальными каппа последовательностями легкой цепи) лигировали с векторными каркасными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, с получением pEAG2677, для которого вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Выведенная открытая рамка считывания, кодируемая pEAG2677, показана ниже:

```

1  MKLPVRLVL MFWIPASSSE PRGPTIKPSP PCKCPAPNLL GGPSVFIFPP
51  KIKDVLMI SL SPIVTCVVVD VSEDDPDVQI SWFVNNVEVH TAQTQTHRED
101 YNSTLRVVSA LPIQHQDWMS GKEFKCKVNN KDLPAPIERT ISKPKGSVRA

```

151 PQVYVLPPPE EEMTKKQVTL TCMVTDFMPE DIYVEWTNNG KTELNYKNTE
 201 PVLDSDGSYF MYSKLRVEKK NWVERNSYSC SVVHEGLHNN HTTKSFSRTP
 251 GGGGGSNFMY SKTVKRLSKL QEYQQYYPSL TCVMEGKDME DWSCCPTPWT
 301 SFQSSCYFIS TVMQSWTKSQ NNCSVMGADL VVINTKEEQD FITQNLKINS
 351 AYFLGLSDPK GWRHWQWVDQ TPYNKNVTFW HSGEPNSPDE RCAIINFRSE
 401 EWGWNDVHCH VPQKSICKMK KIYI* (SEQ ID NO:79)

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

мышинная Fc IgG2: остатки 20-251, смотрите выше;

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

эктодомен cynoBDCA2: остатки 257-425, смотрите выше (подчеркнуто).

Стабильная клеточная линия CHO, продуцирующая слитый белок Fc-cynoBDCA2, была получена путем трансфекции с вектором экспрессии pEAG2677.

Слитые белки muIgG2a FC-BDCA2 подвергались ограниченному протеолизу для выделения мономерных белков эктодомена BDCA2. Для более легкого выделения рекомбинантного растворимого эктодомена BDCA2 были сконструированы новые гибридные конструкции Fc, в которые был вставлен сайт расщепления протеазой TEV между С-концом Fc и N-концом эктодомена BDCA2. Были созданы сингены, несущие эктодомены BDCA2 человека или обезьян циномолгус, с сайтом 5' XmaI (Pro-Gly) для слияния с С-концом Fc, с последующим внутрирамочным сайтом TEV расщепления (ENLYFQG), слитым с остатком 45 из последовательности BDCA2, и с 3' сайтом BamHI после терминатора BDCA2, и эти сингены были получены от GeneWiz в виде вставки XmaI-BamHI в их собственный pUC57-амп. клонирующий вектор. Были подтверждены последовательности вставок в созданных конструкциях кДНК XmaI-BamHI TEV-BDCA2 эктодомена, pEAG2917 (человеческой) и pEAG2918 (обезьян циномолгус). Для конструирования экспрессирующих векторов CHO на основе pV90-IRES-dhfr для слитых белков Fc-hulgG1-TEV-BDCA2, фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1397 и фрагменты 0,54 кб XmaI-BamHI из pEAG2917 или из pEAG2918

субклонировали в векторный каркасный фрагмент 5,4 кб BglII-NotI из pXJC194, с получением pEAG2937 (Fc-huBDCA2) или pEAG2938 (Fc-обезьян циномолгус BDCA2). Вставленные последовательности кДНК в pEAG2937 и pEAG2938 были подтверждены. Стабильные клеточные линии CHO были получены путем трансфекции с pEAG2937 и pEAG2938. Выведенная открытая рамка считывания слитого белка huFc-TEV-huBDCA2, кодируемого pEAG2937, показана ниже:

```

1  MKLPVRLLLVL MFWIPASSSE PKSSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
51 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKT SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
201 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG
251 ENLYFQGNFM YSKTVKRLSK LREYQQYHPS LTCVMEGKDI EDWSCCPTPW
301 TSFQSSCYFI STGMQSWTKS QKNCSVMGAD LVVINTREEQ DFIIQNLKRN
351 SSYFLGLSDP GRRHWQWVD QTPYNENVTF WHSGEPNNLD ERCAIINFRS
401 SEEWGWNDIH CHVPQKSICK MKKIYI* (SEQ ID NO:80)

```

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

человеческая Fc IgG1: остатки 20-250, смотрите выше;

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

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

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

```

1  MKLPVRLLLVL MFWIPASSSE PKSSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
51 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKT SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
201 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG
251 ENLYFQGNFM YSKTVKRLSK LQEQQQYYPS LTCVMEGKDM EDWSCCPTPW
301 TSFQSSCYFI STVMQSWTKS QNNCSVMGAD LVVINTKEEQ DFITQNLKIN
351 SAYFLGLSDP KGWRHWQWVD QTPYNKNVTF WHSGEPNSPD ERCAIINFRS
401 EEWGWNVDVHC HVPQKSICKM KKIYI* (SEQ ID NO:81)

```

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

человеческая Fc IgG1: остатки 20-250, смотрите выше;

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

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

Пример 21. Связывание ВІІВ059 со слитыми белками BDCA2-Fc

Способность ВІІВ059 связываться с huBDCA2-Fc в растворе оценивали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (фиг.11). При раздельном анализе ВІІВ059 (верхнее изображение) и huBDCA2 (среднее изображение) элюировали в виде отдельных острых пиков с молекулярными массами примерно 150 кДа. При анализе смеси ВІІВ059 и huBDCA2-Fc (нижнее изображение) наблюдается смещение молекулярных масс ВІІВ059 и huBDCA2-Fc в сторону увеличения больше 550 кДа, что подтверждается их элюированием на более ранних положениях на хроматограмме. Гетерогенность пиков элюирования предположительно вызвана тем фактом, что каждый из ВІІВ059 и BDCA2-Fc содержит 2 сайта связывания и, следовательно, образуется большое количество комплексов ВІІВ059 и BDCA2 с различными параметрами стехиометрии.

Связывание супоBDCA2 ECD с ВІІВ059 также оценивали в анализе SEC, и это связывание также вызывало количественный сдвиг к комплексам с более высокой молекулярной массой.

Пример 22. Кальций усиливает связывание ВІІВ059 с BDCA2

Было исследовано связывание ВІІВ059 с BDCA2 человека, слитым с мышиной Fc (huBDCA2-muFc) в присутствии кальция или ЭДТА в анализе связывания ОСТЕТ. Белок huBDCA2-muFc захватывался на биосенсоре с анти-мышинным Fc с последующей ассоциацией ВІІВ059 и стадией диссоциации. Все стадии проходили в 50 мМ HEPES, pH 7, 100 мМ NaCl, 1 мг/мл БСА, 0,02% Твин 20 и 0,001% азида, содержащей или 10 мМ CaCl₂ или 10 мМ ЭДТА.

Фиг.12 показывает, что ВІІВ059 связывание усиливается путем добавления кальция по отношению к ЭДТА, что приводит к получению сигнала, который примерно в 2 раза выше. Кальций оказывал эффект и на скорость ассоциации и на скорость

диссоциации.

Пример 23. Измерение связывания

Анализ ОСТЕТ применяли для мониторинга связывания ВІІВ059 со слитым белком Fc-BDCA2 и BDCA2 ECD. Фиг.13 показывает ОСТЕТ-эксперимент, в котором ВІІВ059 помещали на наконечники ОСТЕТ с анти-человеческими Fc в концентрации 20 мкг/мл. Для стадии ассоциации BDCA2 ECD человека и обезьян циномоглус добавляли в концентрации 2 мкг/мл. Для этого эксперимента использовали буфер 50 мМ HEPES, pH 7, 100 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 1 мг/мл BSA, 0,02% Твин-20 и 0,001% азида. В этих условиях связывание ВІІВ059 с BDCA2 ECD человека и обезьян циномоглус было сопоставимым.

Пример 24. Анализ PBMC для определения значения IC₅₀ для ВІІВ059 при ингибировании TLR9-индуцированной продукции ИФН α

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

Клетки PBMC из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров выделяли центрифугированием с прерывистым градиентом над Фиколлом, промывали в ФБР и ресуспендировали в полной культуральной среде (RPMI с 3% FBS). Высевали 1×10^6 клеток на лунку и стимулировали 10 мкг/мл TLR9-лиганда (CpG-A ODN 2216) в присутствии доз ВІІВ059 и 24F4A-Agly (Fc-урезанная версия ВІІВ059), или контрольного изотипа мАт в диапазоне от 10 мкг/мл до 1 мкг/мл в общем анализируемом объеме 200 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 часов) при 37°C, затем собирали супернатанты для оценки в анализе ИФН α ELISA (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя. Анализировали титрование ВІІВ059 и 24F4A agly для определения IC₅₀ при ингибировании TLR9-индуцированной продукции ИФН α . В общей сложности в двенадцати

независимых экспериментах были получены средние значения IC_{50} 0,001 мкг/мл для ВІІВ059. А-гликозилированное мАт обладало меньшей мощностью, со средним IC_{50} 0,007 мкг/мл (фиг.14).

Также исследовали способность анти-BDCA2 мАт ингибировать продукцию ИФН α после стимуляции физиологически соответствующим лигандом, а именно, сывороткой от пациентов с СКВ. Считается, что СКВ-сыворотка индуцирует ИФН I типа посредством комплексов анти-ДНК аутоантител и иммуностимулирующих гипометилированных ДНК, которые стимулируют TLR9. Клетки PBMC стимулировали сывороткой больного СКВ (предоставленной Dr. Gregg Silverman, NYU) и использовали в конечном разведении 1/5. Антитело 24F4S H4/L1C95S, которое отличается от ВІІВ059 одним аминокислотным остатком, полностью устраняет продукцию ИФН α из клеток pDC, стимулированных сывороткой СКВ (фиг.18).

Пример 25. TLR9-индуцированная продукция ИФН α в цельной крови

Активность ВІІВ059 также оценивали в анализе цельной крови по TLR9-индуцированной продукции ИФН α .

Цельную кровь брали из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров. Дозы ВІІВ059 и 24F4A-agly варьировались от 10 до 1 мкг/мл в общем анализируемом объеме 200 мкл на лунку. Добавляли CpG-A в количестве 200 мкг/мл, которое было определено как оптимальное для стимуляции продукции ИФН α в цельной крови. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C, затем собирали супернатанты для использования в анализах ELISA ИФН α (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя. На фиг.15А показан репрезентативный эксперимент из 6 выполненных независимых экспериментов. Ингибирующий потенциал ВІІВ059 в анализе TLR9-индуцированной продукции ИФН α в цельной крови был аналогичен активностью, выявленной в анализах PBMC. В дополнение к ингибированию цитокинов, продуцируемых pDC (ИФН α , ИЛ-6), обработка с помощью ВІІВ059 также приводила к ингибированию большого массива цитокинов и хемокинов (фиг.15С).

Следующий эксперимент проводили для определения возможности ВІІВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФН α в цельной крови от больных СКВ, аналогично тесту на здоровых добровольцах. С этой целью цельную кровь от 2 больных СКВ или от 2 здоровых доноров стимулировали 200 мкг/мл CpGA в присутствии 10 мкг/мл ВІІВ059, после чего оценивали продукцию ИФН α с помощью ELISA. В частности, цельная кровь от 2 больных СКВ или от 2 здоровых доноров была предоставлена Bioreclamation LLC с доставкой течение ночи. После получения кровь обрабатывали 10 мкг/мл ВІІВ059 или контрольным изотипом, стимулировали 200 мкг/мл CpG-A и высевали в 96-луночный планшет. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA ИФН α (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя.

Как показано на фиг.15В, ВІІВ059 показывает одинаковую эффективность в цельной крови от больных СКВ по сравнению тестом на здоровых добровольцах.

Пример 26. Оценка ВІІВ059-опосредованного ингибирования интерферонов I типа

Ингибирующее действие ВІІВ059 также подтверждали с помощью очищенных клеток pDC, стимулированных или синтетическими агонистами TLR (CPG-A), или более физиологичным стимулом (СКВ-сыворотка). Также определяли ингибирующий эффект перекрестного связывания BDCA2 на другие цитокины (ИЛ-6), продуцируемые клетками pDC. Активность ВІІВ059 подтверждали с помощью различных подходов, таких как качественная полимеразная цепная реакция и ELISA.

а) Q-ПЦР

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

Клетки pDC очищали с использованием технологии двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Клетки pDC в количестве 5×10^4 на лунку стимулировали 5 мкМ CpG-A в отсутствие ВІІВ059 или в присутствии ВІІВ059 в возрастающих концентрациях, или 10 мкг/мл контрольного изотипа. Общий анализируемый объем составлял 200 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C, затем РНК экстрагировали из клеток с использованием средства Тризол (корпорация Invitrogen) и дополнительно очищали с помощью колонки RNeasy Mini (Qiagen Sciences). Все праймеры и зонды были приобретены в компании Applied Biosystems Inc. Относительное количество транскриптов определяли для каждого образца путем сравнения со стандартной кривой олигонуклеотидов с использованием программного обеспечения детекции последовательностей (Sequence Detection Software, Applied Biosystems Inc.) и стандартизировали по контролю (GAPDH).

Обработка с помощью ВІІВ059 ингибировала транскрипцию всех тестируемых интерферонов I типа, таким образом, были воспроизведены предыдущие данные с использованием клона AC144 антитела против BDCA2 (Cao W. et al, PLoS Biol, 5(10):e248 (2007)).

b) ELISA

Эффект ВІІВ059 на ингибирование цитокинов посредством pDC проверяли на белковом уровне с помощью ELISA. Клетки pDC в количестве 5×10^4 на лунку стимулировали 5 мкМ CpG-A в отсутствие ВІІВ059 или в присутствии ВІІВ059 в возрастающих концентрациях, или 10 мкг/мл контрольного изотипа. На фиг.17 показано количество секретируемого ИФН α и ИЛ-6, измеренное у репрезентативного донора из трех тестируемых здоровых доноров.

Лигирование BDCA2 с ВІІВ059 мощно индуцирует продукцию ИФН α и значительно снижает продукцию ИЛ-6, индуцированную стимуляцией CpG-A.

Пример 27. ВІІВ059-опосредованная интернализация рецепторов

Было показано, что лигирование BDCA2 с анти-BDCA2 мАт (клон AC144, Miltenyi) быстро индуцирует интернализацию рецепторов (Dzionic A. et al, J. Immunol., 165 (11): 6037-46 (2000)). Следующий эксперимент был направлен на определение кинетики ВІІВ059-опосредованной интернализации BDCA2.

Человеческую цельную кровь обрабатывали ВІІВ059 в концентрации 10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл или контрольным изотипом (10 мкг/мл) при 37°C в течение указанного времени, а затем инкубировали в течение 30 минут при 4°C с FITC-меченным не-перекрестным блокирующим анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLADR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Эритроциты лизировали буфером IX Easy-lyse (BD Bioscience) и оставшиеся клетки фиксировали. На фиг.19а показаны значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) при 2D6-FITC окрашивании клеток рDC CD14-CD20-HLA-DR+CD123+, дающих сигнал выше порогового значения. FMO (контрольная флуоресценция минус один) состояла из коктейля FACS окрашивания минус 2D6-FITC. Данные на этой фигуре отражают репрезентативный эксперимент из 3 выполненных независимых экспериментов.

Как показано на фиг.19А, при инкубации с ВІІВ059 1 мкг/мл, интенсивность FITC-меченого 2D6-окрашивания быстро снижалась, достигая исходного уровня в течение одного часа инкубации при 37°C. Десятикратное снижение концентрации ВІІВ059 (0,1 мкг/мл) влияло на кинетику эндоцитоза, задерживая его на 2 часа. Это показывает, что интернализация BDCA2 при связывании с ВІІВ059 проходит с дозозависимой кинетикой.

Следующий эксперимент проводили для определения возможного влияния ВІІВ059-опосредованной интернализации рецептора на ингибирование ИФН. Цельную кровь собирали из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров и предварительно инкубировали с ВІІВ059 (для осуществления интернализации рецепторов) или с изотипом в течение указанного времени. В каждой точке времени после предварительной инкубации проводили провокацию клеток

введением 200 мкг/мл CPGA, и инкубировали в течение дополнительных 18 часов при 37°C. Супернатанты собирали для использования в анализах ИФН α ELISA (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя.

Фиг.19В показывает репрезентативный эксперимент из 3 выполненных независимых экспериментов. Как показано на фиг.19В, через 9 часов предварительная инкубация с ВІІВ059 перед стимуляцией-в соответствии с максимальной интернализацией-не влияет на ингибирование ИФН, и предполагается наличие потенциальной связи между эндоцитозом BDCA2 и ингибированием TLR9. Для проверки этой гипотезы были использованы анти-BDCA2 моноклональные антитела, которые не могли опосредовать ингибирование ИФН и продемонстрировали отсутствие интернализации. Дополнительно, авторы показали, что бивалентное связывание было необходимо для анти-BDCA2-опосредованного ингибирования ИФН. Фактически, Fab-фрагмент не вызывал интернализацию или ингибирование ИФН. Полученные данные в совокупности указывают на возможность того, что для BDCA2-опосредованного ингибирования TLR9 необходим эндоцитоз и локализация в эндосомальных компартментах, содержащих TLR9. Эту гипотезу можно проверить с помощью живой визуализации для отслеживания интернализации BDCA2 и перемещения в клетку после лигирования ВІІВ059.

Пример 28. Эффекторная функция антитела

Домен Fc ВІІВ059 является полностью гликозилированным человеческим IgG1 и компетентным для связывания и с клеточными рецепторами Fc γ и с комплементом, и для индукции клеточных ответов эффекторных иммунных клеток, как посредством антиген-зависимой цитотоксичности (ADCC), так и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Для того, чтобы подтвердить связывание ВІІВ059 с Fc-рецепторами, проводили измерение относительных показателей аффинности связывания с использованием гомогенного анализа с усиленной люминесцентной близостью (ALPHA) по методике Perkin Elmer (фиг.20). Анализ проводили в конкурентном формате, при котором серийные разведения тестовых антител

инкубировали со слитыми белками рецептор-GST и анти-GST акцепторными шарикам в течение ночи при 4°C в 96-луночном планшете. Стрептавидиновые донорные шарики и биотинилированный IgG1 дикого типа также инкубировали в течение ночи при 4°C в отдельной пробирке, и затем на следующий день добавляли в планшет для анализа. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при осторожном встряхивании, затем считывали в ридере Envision (Perkin Elmer). Чтобы определить относительные значения аффинности связывания, полученные данные наносили на 4-параметрическую кривую аппроксимации, используя программное обеспечение GraphPad Prism для вычисления значений IC₅₀. Были рассчитаны IC₅₀ значения для BIIIB059 FcγR1: 0,03 мкг/мл, FcγR11a: 11 мкг/мл, FcγR11b: 17 мкг/мл и FcγR111a: 3 мкг/мл. Эти значения сопоставимы со значениями, которые выявлены и для других человеческих IgG1 антител в этом тесте. Были также определены значения IC₅₀ для версии 24F4 с низкой эффекторной функцией G4P/G1 agly, используемой в исследованиях с обезьянами циномолгус. Как и предполагалось, не было обнаружено связывание с FcγR11a, FcγR11b и FcγR111a, а связывание с FcγR1 было снижено в 100 раз. Антитело 5с8 в каркасах IgG1 дикого типа и G4P/G1 agly было включено в анализы в целях сравнения.

Пример 29. Фиксация комплемента

Было показано, что покрытие антителами мишеней опосредует мощные механизмы уничтожения посредством ADCC или CDC. Эти эффекторные функции антител опосредуются Fc-областью антитела. Этот эксперимент был направлен на определение способности BIIIB059 к рекрутингу комплемента путем тестирования его связывание с C1q способом ELISA.

Анализ связывания с C1q проводили в 96-луночном планшете ELISA с использованием планшетов Maxisorb ELISA. Тестируемые антитела наносили сериями в 3-кратном разведении в ФБР, начиная с 15 мкг/мл, выдерживали в течение ночи при 2-8°C, затем лунки промывали ФБР, 0,05% Твин 20 и блокировали 200 мкл 0,1 М фосфата натрия, рН 7,2, 0,1 М NaCl, 0,1% желатина, 0,05% Твин

20. Затем добавляли 50 мкл на лунку 2 мкг/мл человеческого C1q от Complement Technology (A099), разведенного в блокирующем/разбавляющем буфере, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После аспирации и промывки, как описано выше, добавляли 50 мкл на лунку куриного IgY против человеческого C1q (коммерческая продукция Aves Labs, Inc., с использованием человеческого C1q, C0660 от Sigma), разведенного в 8000 раз в блокирующем/разбавляющем буфере. После инкубации в течение 1,5 часа при комнатной температуре лунки аспирировали и промывали, как описано выше. Ослиный F(ab')₂ анти-куриный IgY конъюгат пероксидазы хрена (Jackson ImmunoResearch 703-030-155) разбавляли до 5000 раз в блокирующем/разбавляющем буфере, после чего добавляли в концентрации 50 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После аспирации и промывки, как описано выше, добавляли 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (420 мкМ ТМБ, 0,004% H₂O₂ в 0,1 М буфере ацетат натрия/лимонная кислота, pH 4,9) и инкубировали в течение 2 минут до прекращения реакции путем добавления 100 мкл 2 н. серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм на оборудовании PRO SoftMax, и использовали программное обеспечение SoftMax для определения относительной аффинности связывания (C-значение) с подбором 4 параметров.

Фиг.21 показывает, что хотя ВІІВ059 способны связываться с C1q, 24F4A IgG4.P/IgG1 agly по существу лишены связывания с C1q.

Пример 30. Исследование истощения клеток

ВІІВ059 мощно подавляет продукцию ИФН I типа и ИЛ-6 после лигирования с BDCA2. В дополнение к агонистическому действию, были проведены следующие эксперименты для оценки возможности ВІІВ059 истощать клетки pDC, несущие BDCA2, посредством своей функциональной Fc-области. Для исследования цитотоксического потенциала ВІІВ059 была протестирована его активность в анализах ADCC и CDC.

а) Анализ ADCC

ADCC представляет собой механизм, посредством которого

эффекторные клетки иммунной системы активно лизируют клетки-мишени, к поверхностным рецепторам которых были присоединены антитела (фиг.22).

В качестве мишени использовали клеточную линию CHO (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2). Уровень экспрессии BDCA2 на поверхности клеток CHO определяли с помощью FACS с использованием APC-меченых анти-BDCA2 мАт (клон AC144, Miltenyi). Клетки НК были использованы в качестве эффекторных клеток, которые были выделены из цельной крови с помощью негативной селекции с использованием обогащенного коктейля человеческих НК-клеток RosetteSep™ (Human NK Cell Enrichment Cocktail (Stem Cells Technologies)). После 20-минутной инкубации с этим коктейлем при комнатной температуре НК-клетки выделяли центрифугированием в прерывистом градиенте над Фиколлом. Клетки CHO и человеческие НК-клетки высевали в соотношении 5:1 (НК:CHO) в присутствии эффекторных компетентных анти-BDCA2 моноклональных антител (24F4S и BIIIB059), Fc-урезанных мАт (24F4S-Agly и 24F4A-Agly) или контрольного изотипа IgG1, и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Отрицательный контроль состоял из лунок, содержащих клетки CHO и НК без антител. Клетки НК и клетки CHO, лизированные с Tx-100, использовали для определения максимального уничтожения. ADCC оценивали с использованием набора для анализа цитотоксичности Vybrant (Invitrogen), следуя инструкциям производителя. В анализе были обнаружены Г-6-ФД из поврежденных клеток, на основании Г-6-ФД-зависимой редукции резазурина, который излучает флуоресценцию при 590 нм при возбуждении при 530 нм. Анализ ADCC, показанный на фиг.22, часть А, проводили с использованием клеток CHO с высокой экспрессией BDCA2 (часть С), и в анализе ADCC, согласно фиг.22, часть В, использовали клетки CHO с более низкой экспрессией BDCA2 (часть D).

24F4S вызывали 100% гибель клеток CHO, несущих BDCA2, подобно лизированию тритоном X. Как и предполагалось, а-гликозилированная версия мАт (24F4S-agly) не вызывает ADCC (фиг.22А). При сравнении с 24F4S, BIIIB059 обладает идентичной

активностью ADCC (фиг.22B). Следует отметить, что эффективность уничтожения коррелирует с уровнем экспрессии BDCA2 на клетках CHO (фиг.22C и 22D).

b) Анализ CDC

При комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) C1q связывается с антителом, запуская каскад комплемента и вызывает лизис клеток (фиг.23). Как показано в разделе примера 29, ВІІВ059 может эффективно связываться с компонентом комплемента C1q. Этот эксперимент проводили для подтверждения возможности ВІІВ059 опосредовать CDC.

Стабильно трансфицированные клетки CHO-BDCA2/FcεRIγ (Клон 34.16.7 EAG2456 T1F2) высевали в количестве 5×10^4 клеток в 96-луночные коллагеновые черные планшеты, и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Затем планшеты промывали и инкубировали с комплементом кроличьей сыворотки и пропидиййодидом (PI) в присутствии эффекторных компетентных анти-BDCA2 моноклональных антител (24F4S и ВІІВ059), моноклональных антител с дефицитом эффекторной функции (24F4S-agly и 24F4A-agly) или контрольным изотипом IgG1 в течение 1 часа при 37°C. Отрицательный контроль состоял из лунок без антител, содержащих клетки CHO, комплемент кроличьей сыворотки и PI. Клетки НК и клетки CHO, лизированные с Т-100х, были использованы для определения максимального уничтожения. Планшеты считывали с помощью планшетного ридера Cytoflour Fluorescence (Ex530/em645). Анти-BDCA2 мАт (ВІІВ059 и 24F4S) вызывали гибель клеток посредством CDC аналогично лизированию Тритоном. Как и предполагалось, эффекторно-дефицитные α-гликозилированные моноклональные антитела (24F4S-agly и 24F4A-agly) не опосредовали CDC (фиг.23). ВІІВ059 обладает потенциалом истощения клеток pDC, несущих BDCA2, благодаря своей функциональной Fc-области IgG1. В то время как ВІІВ059 способны проявлять цитотоксическую активность в клетках со сверхэкспрессией BDCA2, предполагается, что они не способны к истощению клеток *in vivo* по причине быстрой, стабильной и почти полной интернализации рецепторов после лигирования ВІІВ059.

Пример 31. Клонирование крысиного гомолога BDCA2 и скрининг на его связывание ВІІВ059

Когда человеческую последовательность кДНК BDCA2 исследовали с помощью BLAST против крысиных последовательностей в базе данных NCBI, было установлено, что ближайшим гомологом являются крысиные Clec4b2, описанные в GenBank под номером NM_001005896. Чтобы определить способность лидерного hu24F4H4/L1 C95A мАт связываться с гомологом крысы BDCA2 человека, клонировали кДНК и конструировали векторы экспрессии для крысиного Clec4b2 и крысиного FcεRIγ. Полноразмерные крысиные последовательности белка Clec4b2 имеют только 51,0% идентичности с человеческими BDCA2. Ниже показано содержащее пробелы выравнивание последовательностей BDCA2 человека (сверху) и крысиного Clec4b2 (снизу):

```

1  MVPEEEEPQDREKGLWWFQLKVWSMAVVSILLLSVCFTVSSVVPHNFMYSK 50
    |. |. ||   || | | :. || || :|. ||| | || . | || : || |
1  MMQEKLPQG..KGGCW.TLRLWSAAVISMLLLSTCFIMSCVVTYQFMMEK 47
    .           .           .           .           .
51  TVKRLSKLREYQQYHPSLTCVMEGKDIED..WSCCPTPWTSFQSSCYFIS 98
    :|||. |   |. . || :| :   |||| | | | || | .
48  PNRRLSEL...HTYNSNFTCCSDGTMVSGKVWSCCPKDWKPFQSHCYFTT 94
    .           .           .           .           .
99  TGMQSWTKSQKNCSVMGADLVVINTREEQDFIIQNLKRNSSYFLGLSDPG 148
    . . | . |.. || || | . || |.. || || | |   |   || || |
95  DFVANWNESKEKCSHMGALLVIHSQEEQDFINGILDTRWGYFTGLSDQ. 143
    .           .           .           .           .
149 GRRHWQWVDQTPYNENVTFWHSGEPPNLDERCAIINFRSSEEWGWNDIHC 198
    |.   ||| : || || || | . || || | || | | : |   || || | : |
144 GQNQWQWIDQTPYNESVTFWHEDEPNNDYEKCV EINH HKDIGWGWNDVVC 193
    .

```

199 HVPQKSICKMKKIYI 213 (SEQ ID NO:1)

||||..||||:

194 SSEHKSICQVKKIYL 208 (SEQ ID NO: 82)

Крысиные Clec4b2 клонировали с помощью РТ-ПЦР из первой цепи кДНК крысиной селезенки с праймерами 5' GAC CTT CTG AAT ATA TGC GGC CGC CAT GAT GCA GGA AAA AC 3' (SEQ ID NO:83) (при этом добавляется сайт 5' NotI и последовательность Козака непосредственно перед инициатором метионином Clec4b2), и 5' CCC ACA GCC ATG GAG GAC AGG ATC CTC ATA AGT ATA TTT TC 3' (SEQ ID NO:84) (при этом добавляется сайт 3' BamHI непосредственно после терминатора Clec4b2). Продукт РТ-ПЦР 0,64 кб очищали и субклонировали в клонирующий вектор pCR2.1ТОРО Invitrogen, получая конструкцию pCN815, в которой вставки подвергали секвенированию. Выполняли сайт-направленный мутагенез на матрице pCN815 с праймерами 5' CAG GAT TTC ATC AAC GGA ATC СТА GAC ACT CGT TGG G 3' (SEQ ID NO:85) и их обратным комплементом, для исправления ошибки ПЦР, в результате чего получали конструкцию pCN822, для которой было подтверждено, что выведенная последовательность Clec4b2 белка идентична последовательности NM_001005896. Был сконструирован вектор экспрессии млекопитающих для полноразмерной кДНК крысиного Clec4b2 путем лигирования фрагмента 0,64 кб NotI-BamHI из pCN822 с векторными каркасными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, для получения экспрессионного вектора pCN834, в котором последовательность вставленной кДНК была подтверждена.

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

1 MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV 50

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

1 MIPAVILFLLLLVEEAAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV 50

. . .

51 RKAATSYEKSDBGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ 86 (SEQ ID NO: 2)

||| | | |||| |||||.|||||||

51 RKADIASREKSDAVYTGLNTRNQETYETLKHEKPPQ 86 (SEQ ID NO: 86)

Крысиные кДНК FcεRIγ клонировали с помощью РТ-ПЦР из первой цепи кДНК крысиной селезенки с праймерами 5' CCC AGC GCT GCA GCC CGC GGC CGC CAT GAT CCC AGC GGT 3' (SEQ ID NO:87) (при этом добавляется сайт NotI и последовательность Козака непосредственно перед инициатором метионином FcεRIγ) и 5' GAA CAC GTG TTG GGA TCC TAT TGG GGT GGT TTC TC 3' (SEQ ID NO:88) (при этом добавляется сайт 3' BamHI сразу после терминатора FcεRIγ). Продукт РТ-ПЦР 0,27 кб очищали и субклонировали в клонирующий вектор pCR2.1TOPO Invitrogen, получая конструкцию pCN816, в которой вставки секвенировали и подтверждали ее идентичность по отношению к NM_001131001. Фрагмент 0,27 кб NotI-BamHI из pCN816 лигировали в векторные каркасные фрагменты 0,66 кб BamHI-XhoI и 4,16 кб XhoI-NotI из pBHS103, для конструирования экспрессионного вектора млекопитающих pCN844, в котором была подтверждена вставка крысиной кДНК последовательности FcεRIγ.

Для определения способности лидерного hu24F4H4/L1 C95A мАТ связываться с поверхностным Clec4b2 крысы, клетки 293Е транзитивно котрансфицировали с экспрессионным вектором репортера EGFP (pEAG1458) и либо с векторами BDCA2 человека/FcεRIγ (pEAG2420 и pEAG2413), либо с векторами крысиного Clec4b2/FcεRIγ (pCN834 и pCN844) в молярных соотношениях 1:1:1. Через 3 дня после трансфекции клетки собирали и окрашивали лидерным hu24F4H4/L1 C95A мАТ в прямом анализе связывания FACS с титрованием в разведении, при

стробироваии на живых EGFP-позитивных клетках. Была отмечена высокая аффинность связывания hu24F4 с поверхностным BDCA2 человека, но при этом не обнаружено связывание с поверхностным Clec4b2 крысы. Это указывает на отсутствие у hu24F4 перекрестной реактивности к ближайшему крысиному гомологу BDCA2 человека.

Пример 32. Введение ВІІВ059 здоровым обезьянам циномолгус приводит к потере BDCA2 с поверхности плазмоцитоидных дендритных клеток, вероятно, посредством интернационализации

Для оценки возможных изменений уровня поверхностных BDCA2 при введении ВІІВ059 обезьянам циномолгус применяли два анализа. В первом анализе, который представлял собой так называемый "прямой" способ, было обнаружено поверхностное связывание ВІІВ059 с анти-человеческим РЕ-меченым вторичным антителом. В идеале, для обнаружения общего BDCA2 можно было бы использовать не-перекрестно блокирующее антитело к BDCA2; однако, такие антитела не существуют. Таким образом, во втором анализе с помощью так называемого "непрямого" способа выполняли обнаружение незанятых BDCA2 путем добавления ВІІВ059, конъюгированного с А647.

Перед введением любых тестируемых агентов, для каждой обезьяны циномолгус была установлена максимальная средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для связывания ВІІВ059 с рDC в 3 различных точках времени (за 3, за 2 и за одну неделю перед однократной инъекцией ВІІВ059). В каждой точке времени титры немеченого ВІІВ059 (от 40 до 0,04 мкг/мл в конечной концентрации) добавляли в аликвоты крови, и проводили обнаружение ВІІВ059 с использованием РЕ-меченого вторичного антитела ("прямой" способ), или проводили оценку свободных BDCA2 с ВІІВ059-А647 ("непрямой" способ). Максимальные значения были взяты из значений на плато в каждом анализе (фиг.24 и 25). Оценка значений показала очень небольшое колебание максимальной MFI для каждой обезьяны циномолгус, и более высокую вариабельность между обезьянами циномолгус, что указывает на вариабельность плотности BDCA2 на клетках рDC у обезьян циномолгус (таблица 2).

Таблица 2. Результаты среднего EC_{50} значения связывания ВІІВ059 с BDCA2 клеточной поверхности на рDC в цельной крови обезьян циномолгус

Цельную кровь забирали от двенадцати обезьян циномолгус, один раз в неделю в течение всего трех недель. Кровь инкубировали с различными концентрациями ВІІВ059 человеческого IgG1 (от 0,04 до 40 мкг/мл, кривая с 6-ю точками, 1:4-кратные разведения). Клетки рDC идентифицировали с помощью проточной цитометрии, как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали анти-человеческим IgG PE-меченым вторичным антителом для обнаружения ВІІВ059, связанного с рецептором BDCA2 на клетках рDC. Значение MFI от PE рассчитывали с программным обеспечением FlowJo, кривые EC_{50} были получены в программном обеспечении GraphPad Prism.

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

* среднее значение из 2-3 экспериментов

После введения носителя, как и ожидалось, ВІІВ059 не были обнаружены и не выявлено каких-либо существенных изменений в уровнях BDCA2, что было оценено по связыванию с ВІІВ059- α 647 (10 мкг/мл) (фиг.26).

После внутривенного (в/в) введения ВІІВ059 в обеих дозах 10 и 1 мг/кг не было обнаружено ВІІВ059 на поверхности, даже сразу через 1 час после инъекции ВІІВ059 (фиг.27 и 28). Кроме того, не было выявлено свободных BDCA2, что оценивали по отсутствию ВІІВ059- α 647 через 38 дней у всех получавших лечение обезьян циномолтус, за исключением обезьяны № 5; концентрация в сыворотке крови у этой обезьяны циномолтус быстро упала на день 10, скорее всего, по причине иммуногенности, выработанной против ВІІВ059.

После подкожного введения более низкой дозы ВІІВ059 (0,2 мг/кг) было выявлено присутствие ВІІВ059 на поверхности pDC в течение короткого периода (в течение 1 часа, исчезли через 6 часов). В той же точке времени (1 час) наблюдалось некоторое количество свободных BDCA2 (13%, 74%, 72% от исходного уровня MFI). Аналогично, лекарство не было обнаружено во всей остальной части исследования, и не был выявлен ни один свободный рецептор BDCA2 до дня 14 после инъекции ВІІВ059 (фиг.29).

У всех обезьян циномолтус появление свободного BDCA2 совпадает с падением уровня лекарства в сыворотке ниже 1 мкг/мл (фиг.30 и 31). Таким образом, 1 мкг/мл предположительно является минимальной концентрацией ВІІВ059, необходимой для опосредования интернационализации всех поверхностных BDCA2.

В таблице 3 приведены значения EC₁₀, EC₅₀ и EC₉₀ интернализации рецептора BDCA2 на клетках pDC после лигирования с ВІІВ059 в цельной крови обезьян циномолтус. Кривые EC₁₀₋₅₀₋₉₀ были получены в программном обеспечении GraphPad Prism с использованием четырех-параметрического подбора.

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

Таким образом, эксперименты, описанные в этом примере, показывают, что: внутривенное введение ВІІВ059 in vivo в высоких дозах (10 и 1 мг/кг) приводит к быстрому исчезновению с клеточной поверхности как доступных BDCA2, так и связанного лекарства, что предполагает интернализацию рецептора. Подкожное введение низкой дозы (0,2 мг/кг) ВІІВ059 приводит к очень кратковременному (в течение 1 часа) обнаружению ВІІВ059 на поверхности pDC. После 6 часов не было обнаружено ВІІВ059 на поверхности клеток pDC. Повторное появление доступных BDCA2 на клеточной поверхности происходит при снижении лекарственного воздействия ниже 1 мкг/мл.

Пример 33: ВІІВ059 ингибирует провоспалительные медиаторы в дополнение ко всем видам ИФН I типа

Лигирование BDCA2 подавляет способность клеток pDC продуцировать интерфероны I типа в ответ на TLR лиганды (фиг.16). Для подтверждения ингибирующей активности анти-BDCA2

мАт, ВІІВ059, очищенные клетки рDC от здоровых доноров были стимулированы синтетическим TLR9-лигандом, CpG-A, в присутствии 10 мкг/мл моноклональных антител ВІІВ059 или контрольного изотипа. Конкретно, клетки рDC от здоровых доноров-людей были выделены с использованием двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Очищенные человеческие клетки рDC в количестве 5×10^4 на лунку оставляли без обработки (среда) или стимулировали 1 мкМ TLR9-лигандом (CpG-A) в присутствии или 10 мкг/мл ВІІВ059 (CpG-A + ВІІВ059) или контрольного изотипа (CpG-A + изотип). Планшеты, содержащие рDC, инкубировали в течение 18 часов при 37°C, и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA или мультиплексных анализах для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов. Эти эксперименты показали, что ВІІВ059 мощно ингибирует TLR9-индуцированные ИФН α и другие цитокины, продуцируемые рDC, такие как ФНО α и ИЛ-6, а также TLR-9 индуцированные хемокины, такие как CCL3, CCL4, CCL5 (фиг.32).

Также исследовали способность ВІІВ059 ингибировать продукцию ИФН α и провоспалительных медиаторов после стимуляции физиологически соответствующим лигандом-иммунными комплексами. В частности, иммунные комплексы (IC) Sm/RNP предварительно получали путем смешивания SM-RNP из тимуса теленка и анти-RNP антител, очищенных из сыворотки больных СКВ в течение 1 часа в бессыывороточной среде. Клетки рDC от здоровых доноров-людей были выделены с использованием разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Клетки рDC в количестве 5×10^4 на лунку оставляли без обработки (среда) или стимулировали предварительно сформированными иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии или 10 мкг/мл ВІІВ059 (IC + ВІІВ059) или контрольного изотипа (IC + изотип). Планшеты, содержащие рDC, инкубировали в течение 18 часов при 37°C, и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA или мультиплексных анализах для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов. Эти исследования

показали, что ВІІВ059 может ингибировать индуцированные иммунными комплексами SM/RNP ИФН α и другие рDC-продуцируемые цитокины, такие как ФНО α и ИЛ-6. ВІІВ059 также ингибирует хемокины, индуцированные иммунными комплексами Sm/RNP, такие как CCL3 и CCL4 (фиг.33).

Пример 34. ВІІВ059 ингибирует Sm/RNP IC-индуцированную транскрипцию подтипов ИФН I типа посредством очищенных человеческих рDC

В организме человека существует тринадцать подтипов ИФН α и единственный член ИФН β . Эффект ВІІВ059 на транскрипцию подтипов ИФН I типа в стимулированных Sm/RNP IC клетках рDC от здоровых доноров-людей оценивали в анализах качественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

Иммунные комплексы Sm/RNP (IC) были предварительно созданы путем смешивания SM-RNP из тимуса теленка и анти-RNP антител, выделенных из сыворотки больных СКВ в течение 30 минут в среде без сыворотки. Клетки рDC от здоровых доноров-людей выделяли с использованием двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Очищенные человеческие клетки рDC в количестве $7,5 \times 10^5$ на лунку оставляли без обработки (среда) или стимулировали предварительно сформированными иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии или 10 мкг/мл ВІІВ059 (IC + ВІІВ059) или контрольного изотипа (IC + изотип). Планшеты, содержащие рDC, инкубировали в течение 16 часов при 37°C и 5% CO₂. Собирали клетки рDC и выделяли РНК из рDC для оценки в реакции кПЦР.

Этот эксперимент показал, что обработка с ВІІВ059 ингибирует уровень транскрипции всех протестированных подтипов ИФН I типа (фиг.34).

Пример 35. ВІІВ059 ингибирует TLR9-индуцированную продукцию ИФН α посредством человеческих PBMC от здоровых доноров и больных СКВ

Клетки рDC играют основную роль в продукции интерферона в ответ на стимуляцию TLR7 и TLR9. Клетки рDC могут продуцировать в тысячу раз больше интерферона, чем какой-либо другой тип

клеток. В этом эксперименте исследовали возможность ВІІВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФН α в культурах моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) без необходимости выделения рDC. Клетки PBMC от здоровых доноров и больных СКВ стимулировали 1 или 5 мкМ лиганда TLR9 (CpG-A) и обрабатывали ВІІВ059 в концентрациях от 10 мкг/мл до 2 нг/мл в общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем собирали супернатанты для оценки в анализах ИФН α ELISA.

Этот эксперимент показал, что ВІІВ059 ингибирует TLR9-индуцированную продукцию ИФН α посредством PBMC от здоровых доноров со средним значением IC₅₀ 0,04±0,05 мкг/мл (фиг.35А и 35С). ВІІВ059 показали одинаковую эффективность в ингибировании TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством PBMC от больных СКВ со средним значением IC₅₀ 0,03±0,01 мкг/мл (фиг.35В и 35С).

Пример 36. ВІІВ059 ингибирует продукцию ИФН α в цельной крови, стимулированной TLR9 лигандом

Активность ВІІВ059 также оценивали в анализах цельной крови (WBA). Цельную кровь от здоровых доноров стимулировали TLR9 лигандом в присутствии ВІІВ059 в возрастающих концентрациях и рассчитывали значение IC₅₀ ингибирования для каждого отдельного донора. Конкретно, цельную кровь от здоровых доноров инкубировали с ВІІВ059 в возрастающих концентрациях в диапазоне от 10 мкг/мл до 2 нг/мл или с контрольным изотипом, в общем анализируемом объеме 200 мкл на лунку. Добавляли CpG-A в количестве 75 мкг/мл (незакрашенные квадраты), которое определяли как оптимальное количество для стимуляции продукции ИФН α в цельной крови. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C, и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA ИФН α (PBL InterferonSource).

Было выявлено, что ВІІВ059 дозозависимым образом ингибирует TLR9-индуцированную продукцию ИФН α в анализах цельной крови и показывает значения IC₅₀, аналогичные значениям,

которое наблюдалось в культурах PBMC (фиг.36).

Пример 37. ВІІВ059 не ингибирует TLR3-индуцированную продукцию ИФН α посредством человеческих PBMC от здоровых доноров-людей

Этот эксперимент проводили для определения возможности других типов клеток, запускаемых с различными лигандами TLR, продуцировать ИФН I типа даже в присутствии ВІІВ059. TLR3 не экспрессируется в клетках pDC и, следовательно, TLR3 лиганд не индуцирует продукцию ИФН посредством pDC. Клетки PBMC от здоровых доноров-людей стимулировали poly:IC, который является лигандом TLR3, способным мощно индуцировать ИФН I типа в основном посредством моноцитов. Конкретно, PBMC от здоровых доноров были стимулированы 1 мкМ лиганда TLR3 (poly:IC) и обработаны ВІІВ059 в концентрации от 10 мкг/мл до 0,5 нг/мл в общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку в 96-луночной планшете. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. 200 мкл супернатантов собирали для оценки уровней ИФН α в анализе ELISA. Как показано на фиг.37, ВІІВ059 не влияет на TLR3-индуцированную продукцию ИФН α посредством PBMC от здоровых доноров-людей.

Таким образом, примеры 33-37 показывают, что ВІІВ059 может эффективно ингибировать TLR9-стимулированную продукцию интерферона I типа посредством очищенных pDC, PBMC и культур цельной крови. ВІІВ059 одинаково мощно ингибирует TLR9-индуцированную продукцию интерферона I типа посредством pDC от здоровых доноров и больных СКВ. В дополнение к ингибированию ИФН I типа, ВІІВ059 может ингибировать продукцию других цитокинов и хемокинов, продуцируемых pDC. ВІІВ059 специфично ингибирует TLR9-индуцированные интерфероны I типа посредством pDC и не влияет на продукцию ИФН посредством других типов клеток, запускаемых другим TLR лигандом. Таким образом, данные *in vitro*, представленные в изобретении, подтверждают фармакологическую активность и потенциал ВІІВ059 в дополнение к его специфичности к TLR7/9-индуцированным ИФН I типа посредством pDC.

Пример 38: ВІІВ059 опосредует интернализацию BDCA2 на человеческих рDC

Для определения способности ВІІВ059 индуцировать интернализацию BDCA2, человеческую цельную кровь от 10 здоровых доноров инкубировали с ВІІВ059 в возрастающих концентрациях при 37°C в течение 16 часов. Остальная часть BDCA2 клеточной поверхности была выявлена с помощью FITC-меченого неперекрестно блокирующего анти-BDCA2 мАт (клон 2D6).

Конкретно, цельную кровь от 10 здоровых доноров-людей инкубировали с ВІІВ059 в возрастающих концентрациях или с 10 мкг/мл контрольного изотипа антитела в течение 16 часов при 37°C и 5% CO₂, и затем инкубировали в течение 30 минут при 4°C с FITC-меченым не-перекрестно блокирующим анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLA-DR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Затем цельную кровь инкубировали в течение 30 минут при 4°C с 50 мкл окрашивающего раствора, который включал в себя следующие мАт: FITC-меченое не-перекрестно блокирующее анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLA-DR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Эритроциты лизировали с помощью IX лизирующего/подгоночного буфера (IX lyse/fit Buffer, BD Bioscience).

Как показано на фиг.38, ВІІВ059 вызывают дозозависимое снижение интенсивности FITC-меченого окрашивания 2D6 со средним значением EC₅₀ 0,017±0,005 мкг/мл.

Пример 39. BDCA2 быстро интернализуются после лигирования с ВІІВ059

Для определения кинетики ВІІВ059-индуцированной интернализации BDCA2 цельную кровь человека инкубировали с ВІІВ059 в разных концентрациях при 37°C в течение разных периодов времени. Конкретно, цельную кровь обрабатывали ВІІВ059 в концентрации 10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл или контрольным изотипом антитела (10 мкг/мл) при 37°C в течение указанных периодов. Цельную кровь инкубировали в течение 30 минут при 4°C с 50 мкл окрашивающего раствора, который включал в себя следующие мАт: FITC-меченое не-перекрестно блокирующее анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLA-DR, анти-CD123, анти-CD14 и

анти-CD20. Эритроциты лизировали и фиксировали при помощи IX Lyse/fit буфера (BD Bioscience). Как показано на фиг.39, при инкубации с ВІІВ059 в концентрации 1 мкг/мл интенсивность FITC-меченого окрашивания 2D6 быстро снижалась, достигая исходного уровня в течение одного часа инкубации. Инкубация с ВІІВ059 в концентрации в десять раз ниже (0,1 мкг/мл) задерживала интернализацию BDCA2 на 2 часа. Эти данные показывают, что скорость интернализации BDCA2 зависит от дозы ВІІВ059.

Пример 40. ВІІВ059 индуцирует интернализацию BDCA2 в человеческих плазмоцитоидных дендритных клетках

Для визуализации интернализации BDCA2 после лигирования с ВІІВ059 очищенные pDC инкубировали с A647-мечеными ВІІВ059 и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Как и ожидалось, BDCA2 локализовались на клеточной поверхности pDC при 4°C. После короткой инкубации при 37°C BDCA2 отчетливо обнаруживались внутри клеток (фиг.40).

Пример 41. Интернационализация не изменяет ВІІВ059-опосредованное ингибирование продукции ИФН α

В этом эксперименте исследовали, изменяет ли интернализация BDCA2 способность ВІІВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФН α посредством pDC. Клетки предварительно инкубировали с ВІІВ059 при 37°C в течение разных периодов времени, соответствующих максимальной интернализации BDCA2, и затем стимулировали TLR9 лигандом в течение дополнительных 18 часов. Конкретно, цельную кровь собирали из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров и предварительно инкубировали с ВІІВ059 или контрольным изотипом антитела в течение указанных периодов времени. В каждой точке времени после предварительной инкубации клетки стимулировали TLR9 лигандом в количестве 200 мкл/мл (CpG-A) и инкубировали в течение дополнительных 18 часов при 37°C. Супернатанты собирали для использования в анализах ИФН α ELISA (PBL InterferonSource). Как показано на фиг.41, предварительная инкубация с ВІІВ059 (до 9 часов) не изменяет способность ВІІВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФН α в анализах цельной крови здоровых

доноров-людей. Эти данные позволяют предположить, что интернализация BDCA2 может быть необходимой для ингибирования сигнального пути TLR9.

Пример 42. EC_{50} ВІІВ059-опосредованной BDCA2 интернализации на рDC коррелирует с IC_{50} ВІІВ059-опосредованного ингибирования TLR9-индуцированных ИФН α посредством рDC в анализах цельной крови

Для дальнейшего изучения связи между интернализацией BDCA2 и ингибированием сигнального пути TLR9, у 10 здоровых доноров-людей сравнивали мощность ВІІВ059-опосредованной интернализации BDCA2 на клетках рDC и ингибирование TLR-опосредованной продукции ИФН α посредством рDC.

Для оценки ВІІВ059-опосредованной BDCA2 интернализации цельную кровь инкубировали с ВІІВ059 в течение 16 часов. Собирали и лизировали цельную кровь, затем экспрессию BDCA2 оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием FITC-конъюгированного не-перекрестно блокирующего антитела 2D6. Чтобы оценить ВІІВ059-опосредованное ингибирование TLR9-индуцированных ИФН α посредством рDC, цельную кровь инкубировали с ВІІВ059 в возрастающих концентрациях в течение 16 часов в присутствии лиганда TLR9. Супернатанты собирали и оценивали с помощью ИФН α ELISA. Значение EC_{50} ВІІВ059-опосредованной интернализации BDCA2 составляет 0,02 мкг/мл. Значение IC_{50} ВІІВ059-опосредованного ингибирования TLR9-индуцированных ИФН α составляет 0,07 мкг/мл. Корреляция между значениями EC_{50} ВІІВ059-опосредованной интернализации BDCA2 и IC_{50} ВІІВ059-опосредованного ингибирования ИФН α была выявлена путем расчета квадрата значения $R=0,57$ (фиг.42).

Пример 43. Активация TLR9 индуцирует колокализацию BDCA2 с TLR9 и с лизосомальным маркером LAMP1

Для проверки гипотезы, что для ВІІВ059-опосредованного ингибирования TLR9 требуется интернализация и локализация BDCA2 в эндосомальных/лизосомальных компартментах, содержащих TLR9, выполняли конфокальную микроскопию для отслеживания внутриклеточного распределения BDCA2 после лигирования с

ВІІВ059. Очищенные человеческие рDC культивировали в течение 7 дней и инкубировали с А647-мечеными ВІІВ059 в течение 15 минут при 37°C. Во время последних 10 минут инкубации клетки обрабатывали 1 мкМ TLR9 лиганда CpG-A или оставляли без обработки. Клетки окрашивали флуоресцентно мечеными антителами на TLR9 и поздний эндосомальный/лизосомальный маркер, Lamp1, и анализировали с помощью конфокальной микроскопии.

Наблюдали рекрутинг TLR9 в поздний эндосомальный/лизосомальный компартмент после стимуляции TLR9 лигандом, о чем свидетельствует повышенная колокализация TLR9 с Lamp1 (фиг.43). Стимуляция TLR9 также значительно повышала фракцию BDCA2, колокализирующих с TLR9 и Lamp1. Эти результаты показывают, что ВІІВ059, находящиеся в связи с BDCA2, преимущественно локализуются во внутриклеточных компартментах, где присутствует активированный TLR9.

В общем, примеры 38-43 показывают, что ВІІВ059, гуманизированное моноклональное антитело против BDCA2, вступает в контакт с BDCA2 и вызывает его интернализацию. При стимуляции BDCA2 колокализуются с TLR9 в эндосомальном/лизосомальном компартменте, где они опосредуют ингибирование сигнального пути TLR9. Эти данные позволяют предположить, что интернализация BDCA2 является необходимым этапом для опосредования ингибирования TLR9-индуцированных провоспалительных медиаторов посредством рDC.

Пример 44. Влияние ВІІВ059 на уровень CD62L

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

Для определения влияния ВІІВ059 на экспрессию CD62L на поверхности человеческих рDC цельную кровь обрабатывали ВІІВ059 в разных концентрациях в течение 1 часа при 37°C без стимуляции. Конкретно, цельную кровь от здоровых доноров обрабатывали ВІІВ059 в возрастающих концентрациях в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂. Значение MFI от CD62L устанавливали стробированием клеток рDC, что определяли по CD14-, CD20-, HLA-DR+ и CD123+.

ВІІВ059 вызывает дозозависимое уменьшение экспрессии CD62L на поверхности человеческих рDC, что определяли с помощью проточной цитометрии (фиг.44). Стимуляция клеток рDC TLR-лигандом не влияет на экспрессию CD62L (фиг.44А).

Пример 45. Обработка PBMC с GM6001 ингибирует ВІІВ059-опосредованный шеддинг CD62L с поверхности человеческих рDC

Известно, что металлопротеиназы индуцируют шеддинг CD62L с поверхности иммунных клеток. Чтобы исследовать участие металлопротеиназ в ВІІВ059-опосредованном уменьшении количества поверхностных CD62L, от здоровых доноров получали клетки PBMC и предварительно их обрабатывали с GM6001 (ингибитором металлопротеиназы) в течение 30 минут при 37°C и 5% CO₂, с последующим добавлением 10 мкг/мл ВІІВ059 в течение 1 часа. Поверхностную экспрессию CD62L анализировали способом проточной цитометрии. GM6001 ингибирует ВІІВ059-опосредованную понижающую модуляцию CD62L в зависимости от дозы (фиг.45). Эти данные позволяют предположить, что ВІІВ059 индуцирует шеддинг CD62L зависимым от металлопротеиназы образом.

В целом, примеры 44 и 45 показывают, что ВІІВ059 уменьшает экспрессию CD62L на поверхности человеческих рDC. ВІІВ059-опосредованная понижающая модуляция CD62L ингибируется ингибитором металлопротеиназы (GM6001), указывая на то, что ВІІВ059 индуцирует шеддинг CD62L с поверхности человеческих рDC посредством, по меньшей мере частичной активации металлопротеиназы. Поэтому предполагается, что обработка с ВІІВ059 будет уменьшать или предотвращать перемещение клеток рDC в органы-мишени при СКВ.

Пример 46. Влияние Fc-области ВІІВ059 на опосредуемую иммунным комплексом продукцию интерферона посредством плазмоцитоидных дендритных клеток

Fc-гамма-рецептор ІІА (CD32а) представляет собой белок клеточной поверхности, который связывается с IgG с низкой аффинностью. Человеческие плазмоцитоидные дендритные клетки эксклюзивно экспрессируют Fc-гамма-рецептор ІІА-CD32а. Было показано, что стимуляция клеток рDC иммунными комплексами зависит от CD32. Иммунные комплексы интернализируются CD32 и стимулируют эндосомальные TLR7/9, чтобы индуцировать продукцию ИФН посредством рDC.

Для определения влияния ВІІВ059 на поверхностную экспрессию CD32а выделенные клетки рDC обрабатывали с ВІІВ059 в возрастающих концентрациях или α-гликозилированной формой антитела 24F4-А, и инкубировали в течение 16 часов при 37°C. Затем клетки рDC окрашивали FITC-меченым BDCA2 и PE-меченым анти-CD32 (клон AT10), и оценивали поверхностную экспрессию BDCA2 и CD32 с помощью проточной цитометрии. ВІІВ059 и agly вариант 24F4 обладали одинаковым потенциалом в своей способности индуцировать интернализацию BDCA2 (фиг.46А). Только ВІІВ059 были способны индуцировать понижающую модуляцию CD32 на клеточной поверхности рDC, что определяли по дозозависимому уменьшению в CD32 средней интенсивности флуоресценции (MFI) (фиг.46В-Д). Обработка контрольным эффекторным компетентным изотипом не имела какого-либо эффекта на уровень поверхностных CD32 (фиг.46). Эти данные показывают, что ВІІВ059-опосредованная понижающая модуляция уровней CD32а на поверхности клеток рDC является специфичной для связывания Fc-области ВІІВ059.

Чтобы гарантировать, что связывание с Fc-областью ВІІВ059 не просто маскирует эпитоп CD32, распознаваемый FITC-меченым анти-CD32 мАт, клетки рDC обрабатывали 10 мкг/мл ВІІВ059 в течение 1 часа при 4°C или 37°C, а затем окрашивали мечеными анти-CD32. Как показано на фиг.46Е, обработка с ВІІВ059 при 4°C не уменьшает значение MFI в CD32, указывая, что обработка с

ВІІВ059 не препятствует связыванию меченого анти-CD32 мАт. Тот факт, что понижающая модуляция CD32а происходит только после инкубации с ВІІВ059 при 37°C, показывает, что CD32а могут исчезать с клеточной поверхности рDC.

Чтобы определить, имеет ли биологическое значение понижающая модуляция CD32а посредством ВІІВ059, клетки рDC инкубировали в присутствии ВІІВ059 в возрастающих концентрациях или в присутствии гликозилированной формы 24F4A-Agly, и стимулировали или иммунными комплексами или синтетическим лигандом TLR9 (CPG-A). Как и предполагалось, ВІІВ059 и 24F4A-Agly были неотличимы в своей способности ингибировать CPG-A-индуцированную продукцию ИФН α посредством рDC, которая не зависит от CD32 (фиг.47А). Выявлено четкое разделение по потенциалу между ВІІВ059 и 24F4A-Agly при стимуляции клеток рDC иммунными комплексами. ВІІВ059 ингибирует ИФН α , индуцированные иммунными комплексами при значении IC₅₀=0,04, по сравнению с IC₅₀ при 24F4A-Agly=1,4 мкг/мл. (фиг.47В). Эти данные показывают, что ВІІВ059 вызывает понижающую модуляцию CD32а благодаря своей функциональной Fc-области и, следовательно, ингибирует стимуляцию клеток рDC посредством иммунных комплексов.

Чтобы подтвердить, что понижающая модуляция CD32а является уникальной для ВІІВ059, авторы исследовали эффект полностью гуманизированного анти-CD40-антитела на уровне CD32 и опосредуемой иммунным комплексом продукции ИФН α посредством рDC. CD40 представляет собой белок клеточной поверхности, экспрессируемый на клетках рDC. Анти-CD40-антитело с полностью функциональной Fc обладает способностью вступать в контакт с CD40 и связываться с CD32 на поверхности клеток рDC. Обработка с анти-CD40 мАт не влияет на поверхностную экспрессию CD32 и не оказывает существенного влияния на продукцию ИФН α из рDC, стимулированных иммунным комплексом (фиг.48А и В). Связывание анти-CD40 мАт было подтверждено путем демонстрации максимального захвата CD40 в клетки, обработанные анти-CD40 (фиг.48С).

Как было показано ранее, лигирование BDCA2 с ВІІВ059 или α -гликозилированной формой 24F4A-agly приводит к интернализации рецепторов и ингибированию TLR9-индуцированных ИФН α посредством pDC. В этом исследовании авторы показали, что ВІІВ059 вызывает понижающую модуляцию CD32a на клетках pDC и ингибирование стимулированной иммунным комплексом продукции ИФН α посредством pDC Fc-зависимым образом. Понижающая модуляция CD32a, запускаемая ВІІВ059, не является результатом любого антитела с функциональной Fc-областью, которое способно связываться с молекулой клеточной поверхности, экспрессируемой на pDC. Это исследование подчеркивает новый терапевтический потенциал эффекторных компетентных анти-BDCA2 мАт, которые могут ослаблять ответы pDC посредством обеих его областей Fab'2 и Fc, что ведет к повышению эффективности.

Пример 47. Взаимодействие ВІІВ059 с гидроксихлорохином (HCQ)

Для лечения системной красной волчанки применяются противомаларийные агенты, такие как гидроксихлорохин (HCQ). В клетках pDC от больных СКВ, получавших HCQ, уменьшается способность продуцировать ИФН α при стимуляции TLR7 и TLR9 лигандами. Поскольку и ВІІВ059 и HCQ действуют на TLR7/9-индуцированные ИФН α в клетках pDC, было исследовано, может ли быть избыточным эффект ВІІВ059 и HCQ.

Для решения этого вопроса человеческие клетки PBMC получали из крови здоровых доноров и стимулировали их TLR7 или TLR9 лигандами в присутствии только ВІІВ059 в разных концентрациях, только HCQ, или в присутствии ВІІВ059 в комбинации с HCQ. Супернатанты собирали через 18 часов и анализировали на ИФН α способом ELISA. Добавление HCQ повышало потенциал ВІІВ059 и вызывало аддитивный ингибирующий эффект на TLR7- и TLR9-индуцируемую продукцию ИФН α посредством PBMC от здоровых доноров-людей. Эти данные показывают, что активность ВІІВ059 и HCQ не является избыточной и подчеркивают дополнительное терапевтическое преимущество ВІІВ059 при его введении с противомаларийными соединениями, такими как HCQ.

Пример 48. Эффект ВІІВ059 на BDCA2-экспрессирующие pDC in vivo

Целью данного исследования было определить, опосредует ли введение ВІІВ059 обезьянам циномолтус истощение клеток pDC в периферической крови.

Четыре образца крови после предварительного введения ВІІВ059 получали с недельными интервалами от двенадцати обезьян циномолтус для установления исходного уровня pDC для каждого животного (таблица 3).

Таблица 3. Результаты среднего содержания циркулирующих pDC в цельной крови здоровых обезьян циномолтус

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

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

12	0,1	0,05	0,07	0,16	0,10	0,05
Среднее значение	0,16	0,17	0,17	0,21	0,18	
SD	0,08	0,14	0,10	0,10	0,09	

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

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

Девять из этих двенадцати обезьян циномолгус были разделены на 3 группы (по 3 животных на группу), и рандомизированы, чтобы включать равную репрезентативность показателей плотности BDCA2 и процентов pDC в каждой группе. Обезьяны циномолгус получали однократную внутривенную инъекцию носителя (цитрат натрия), или 10 мг/кг ВІІВ059, или 1 мг/кг ВІІВ059. Проточную цитометрию использовали для идентификации циркулирующих pDC в цельной крови как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, а частота pDC (на лог-шкале) в каждой точке времени была

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

Таблица 4. Оценка в подогнанной модели для точек времени после однократной внутривенной инъекции ВІІВ059 или носителя

Оценивали фиксированные эффекты с помощью линейной модели со смешанными эффектами с использованием случайных отрезков для обезьян циномолтус и фиксированных факторов для группы введения и периодов времени 1 час, 6 часов и более 28 дней, для определения процентов циркулирующих pDC на логарифмической шкале до и после в/в введения обезьянам циномолтус носителя цитрата натрия, ВІІВ059 в дозе 1 мг/кг или ВІІВ059 в дозе 10 мг/кг.

	Оцениваемый эффект	Экспонента (оценки эффекта) (% соотношение pDC)	95% доверительный интервал	P
Время: 1 час по сравнению с другими	-0,56	0,57	0,43-0,77	0,0003
Время: 6 часов по сравнению с другими	0,46	1,58	1,18-2,13	0,003
Время: >28 дней по сравнению с другими	-0,48	0,62	0,55-0,70	<0,0001
Группа: ВІІВ059 1 мг/кг по сравнению с носителем	0,49	1,64	1,20-2,25	0,01
Группа: ВІІВ059 10 мг/кг по сравнению с носителем	0,09	1,09	0,79 to 1,50	0,84

Экспоненцирование оценок параметров для основных факторов выполняли для их интерпретации как отношения частот pDC в указанные периоды времени по сравнению с показателями перед введением ВІІВ059. В целом, соотношение было значительно меньше, чем при сравнении частоты pDC через 1 час после в/в инъекции с показателями частоты pDC перед введением (95% доверительный интервал: 0,43-0,77, р-значение: 0,0003). Соотношение было значительно больше, чем при сравнении частоты pDC через 6 часов после в/в инъекции с частотой pDC перед введением (95% доверительный интервал: 1,18-2,12, р-значение: 0,003). Соотношения существенно не отличались друг от друга при сравнении частоты pDC в период от 1 до 28 дня после в/в инъекции с частотой pDC перед введением. Соотношение было значительно меньше, чем соотношение при сравнении частоты pDC через 28 дней после внутривенной инъекции с частотой pDC перед введением (95% доверительный интервал: 0,55-0,70, р-значение: 0,0001). Конечная подогнанная модель показана на фиг.55. Результаты показали, что имеется значительное истощение циркулирующих pDC *in vivo* у обезьян циномолтус в точке времени 1 час, значительное увеличение циркулирующих pDC в точке времени 6 часов и значительное истощение циркулирующих pDC через 28 дней после внутривенной инъекции, но изменения в процентах pDC на протяжении времени были одинаковыми во всех группах введения.

Дополнительно, после завершения в/в исследования в зависимости от времени три из этих обезьян циномолтус (4, 6 и 12) получили однократную подкожную дозу ВІІВ059 0,2 мг/кг для оценки эффекта более низкой дозы на частоту циркулирующих pDC. Частота pDC (на лог-шкале) в каждой точке времени была графически отображена с помощью программного обеспечения R (фиг.56). Линейная модель со смешанными эффектами была подогнана с использованием непрерывного времени и времени 1 час в качестве фиксированных факторов и обезьян циномолтус в качестве случайных отрезков. Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5. Оценка в подогнанной модели для точек времени
после однократной подкожной инъекции ВІІВ059

Оценивали фиксированные эффекты с помощью линейной модели со смешанными эффектами с использованием с использованием непрерывного времени и времени 1 час в качестве фиксированных факторов и обезьян циномолтус в качестве случайных отрезков, для определения процентов циркулирующих рDC на логарифмической шкале до и после однократного подкожного введения обезьянам циномолтус ВІІВ059 в дозе 0,2 мг/кг.

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

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

В заключение, эти данные показывают, что ВІІВ059 не опосредует устойчивое истощение клеток pDC в крови обезьян циномолгус при введении в тестируемых дозах. Вероятно, это обусловлено интернационализацией BDCA2.

Пример 49. Введение ВІІВ059 обезьянам циномолгус вызывает ингибирование TLR9-индуцированной продукции ИФН α в цельной крови *ex vivo*

Целью настоящего исследования было определение возможности ВІІВ059 при введении обезьянам циномолгус *in vivo* изменять продукцию ИФН α в ответ на TLR9-стимуляцию *ex vivo* в анализе цельной крови (WBA).

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

Для обезьян циномолгус из группы внутривенного введения показатели ИФН α после лечения были рассчитаны в процентах от средних значений перед введением для каждого животного. Данные от образцов крови после 14-го дня были исключены из анализа, поскольку анализ цельной крови не проводили в группе введения 10 мг/кг ВІІВ059 после этой точки времени. Наблюдалась тенденция к снижению % ИФН α по сравнению со средними значениями перед введением в течение нескольких дней после введения

препарата ВІІВ059 в группах введения дозы 1 мг/кг и дозы 10 мг/кг по сравнению с группой введения носителя (фигура. 59)

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

Для когорты обезьян циномолтус с подкожным введением использовали односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) со случайными эффектами для оценки средних значений ИФН α и

различий после введения по сравнению с различиями перед введением для всей группы. Данные в течение первых 24 часов после введения были исключены по причине выявленного снижения в периферической крови процента плазмоцитоидных дендритных клеток. Данные от образцов крови после 33-го дня после введения были исключены из анализа по причине возвращения экспрессии BDCA2, которая наблюдается в указанной точке времени. В группе подкожного введения среднее геометрическое значение ИФНа составляло 1243 Ед/мл перед введением и 812 Ед/мл после введения, что давало соотношение после введения – перед введением 65%. Оценка различий после введения – перед введением в среднем $\log_{10}$ составляла $-0,185$ ($p=0,059$), которая после анти- $\log_{10}$ преобразования соответствовала $10^{(-0,185)}=65\%$ от среднего геометрического значения перед введением; 95% доверительный интервал этого эффекта составляет 41–102% (фиг.61).

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

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

Несмотря на наличие некоторых колебаний процентных показателей плазмоцитоидных дендритных клеток у каждого животного на протяжении времени, % клеток pDC в крови не зависит от лечения с ВІІВ059 (смотрите RSch-2013-046) и не проявляет устойчивую корреляцию с продукцией ИФН α . Дополнительно, быстрая и устойчивая потеря BDCA2 с клеточной поверхности наблюдается на клетках pDC после в/в и п/к введения ВІІВ059, что предполагает высокий уровень занятости рецепторов (смотрите RSch-2013-043). С учетом высокого уровня изменчивости в реактивности клеток pDC от обезьян циномолгус на TLR9-стимуляцию, выявлена тенденция к смягчению ответов ИФН α после внутривенного и подкожного введения ВІІВ059, с наибольшим снижением в группе в/в введения 10 мг/кг, далее следует группа п/к введения 0,2 мг/кг, и затем группа в/в введения 1 мг/кг.

В заключение, ВІІВ059 при введении *in vivo* обезьянам циномолгус проявляют тенденцию к ингибированию TLR9-индуцированной продукции ИФН в анализах цельной крови *ex vivo*.

Другие варианты осуществления

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕННОЙ ЗАЯВКИ

1. Способ обнаружения наличия плазмацитоидных дендритных клеток в выделенной ткани, где способ включает приведение ткани в контакт с анти-BDCA2 антителом или его фрагментом, связывающим BDCA-2, где анти-BDCA2 антитело или фрагмент, связывающийся с BDCA, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR VH 2 и CDR3 VH, где:

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

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

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

где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

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

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

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

2. Способ по п.1, где ткань представляет собой ткань биопсии кожи больного человека, страдающего системной красной волчанкой, склеродермией, локализованной склеродермией (морфеа), ревматоидным артритом, псориазом, дерматомиозитом, полимиозитом или воспалительным заболеванием кишечника.

3. Способ по п.1 или 2, где способ дополнительно включает приведение ткани в контакт с анти-CD123 антителом.

4. Способ ингибирования экспрессии CD32a на поверхности плазмацитоидной дендритной клетки у человека, где способ включает введение человеку эффективного количества анти-BDCA2 антитела,

где анти-BDCA2 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSTYTMS

(SEQ ID NO:9);

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

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

где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL),
содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

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

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

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

5. Способ ингибирования стимуляции плазматической дендритной
клетки иммунными комплексами у человека, где способ включает
введение человеку эффективного количества анти-BDCA2 антитела,

где анти-BDCA2 антитело содержит переменный домен тяжелой
цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)
1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

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

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

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

где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL),
содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

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

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

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

6. Способ ингибирования экспрессии CD62L на поверхности
плазматической дендритной клетки у человека, где способ включает
введение человеку эффективного количества анти-BDCA2 антитела,

где анти-BDCA2 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий область определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

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

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

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

где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

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

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

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

7. Способ лечения кожных поражений при системной красной волчанке у больного человека, где способ включает введение человеку эффективного количества анти-BDCA2 антитела,

где анти-BDCA2 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

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

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

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

где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

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

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

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQANEDPRT

(SEQ ID NO:7).

8. Способ по любому из пп.4-7, где домен VH:

(i) по крайней мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24;

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

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

9. Способ по любому из пп.4-7, где антитело содержит тяжелую цепь, и где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

10. Способ по любому из пп.4-7, где домен VH:

(i) по крайней мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23;

(ii) по крайней мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23; или

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

11. Способ по любому из пп.4-7, где антитело содержит легкую цепь, и где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

12. Способ по любому из пп.4-7, где

(i) домен VH по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24, а домен VL по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23; или

(ii) домен VH по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24, а домен VL по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23.

13. Способ по любому из пп.4-7, где домен VH идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24, и домен VL идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23.

14. Способ по любому из пп.4-7, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

15. Композиция, содержащая анти-BDCA2 антитело и

кортикостероид, где анти-BDCA2 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

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

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

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

где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

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

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

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

16. Композиция по п.15, где кортикостероид представляет собой глюкокортикоид.

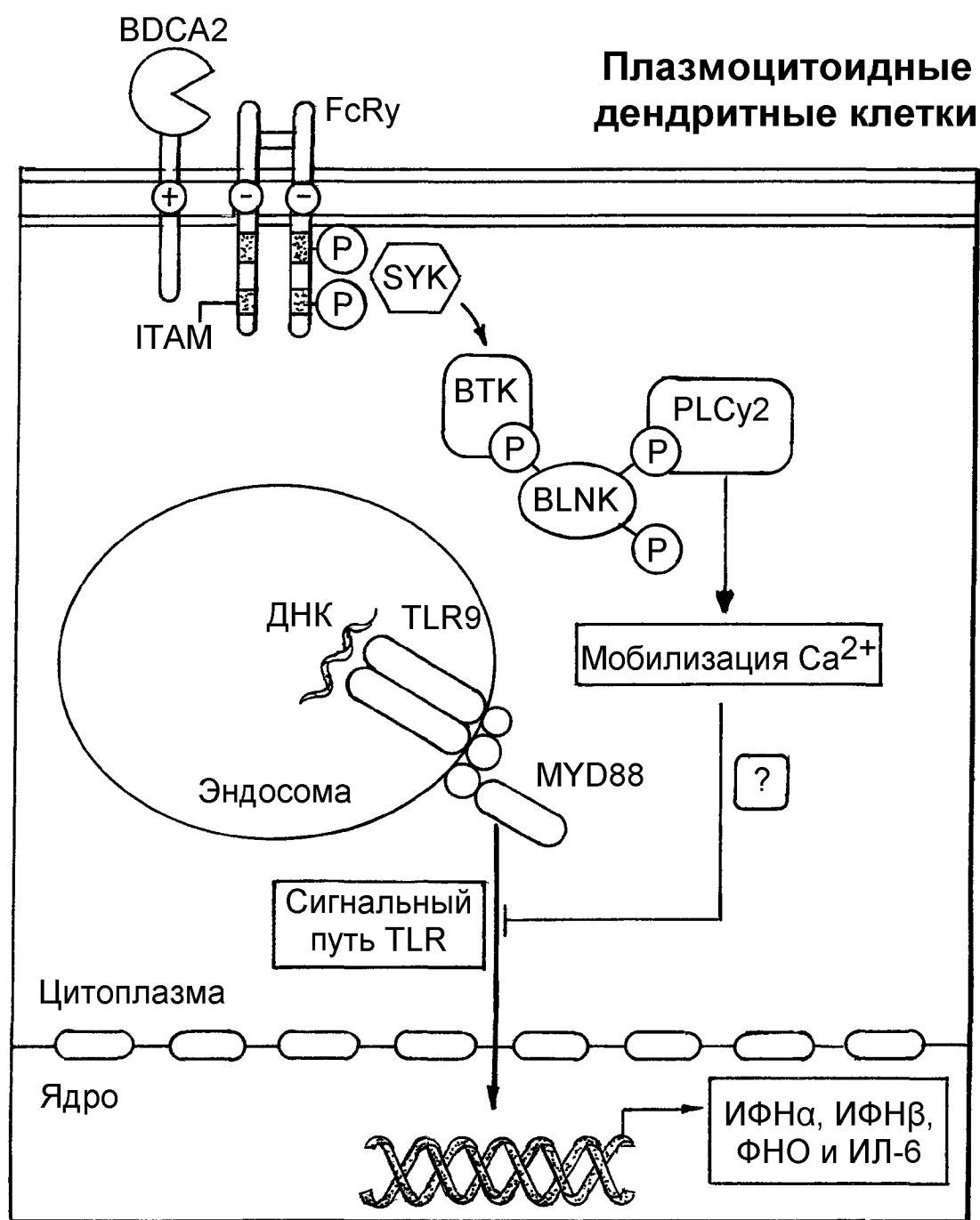
17. Композиция по п.15, где кортикостероид является преднизолоном.

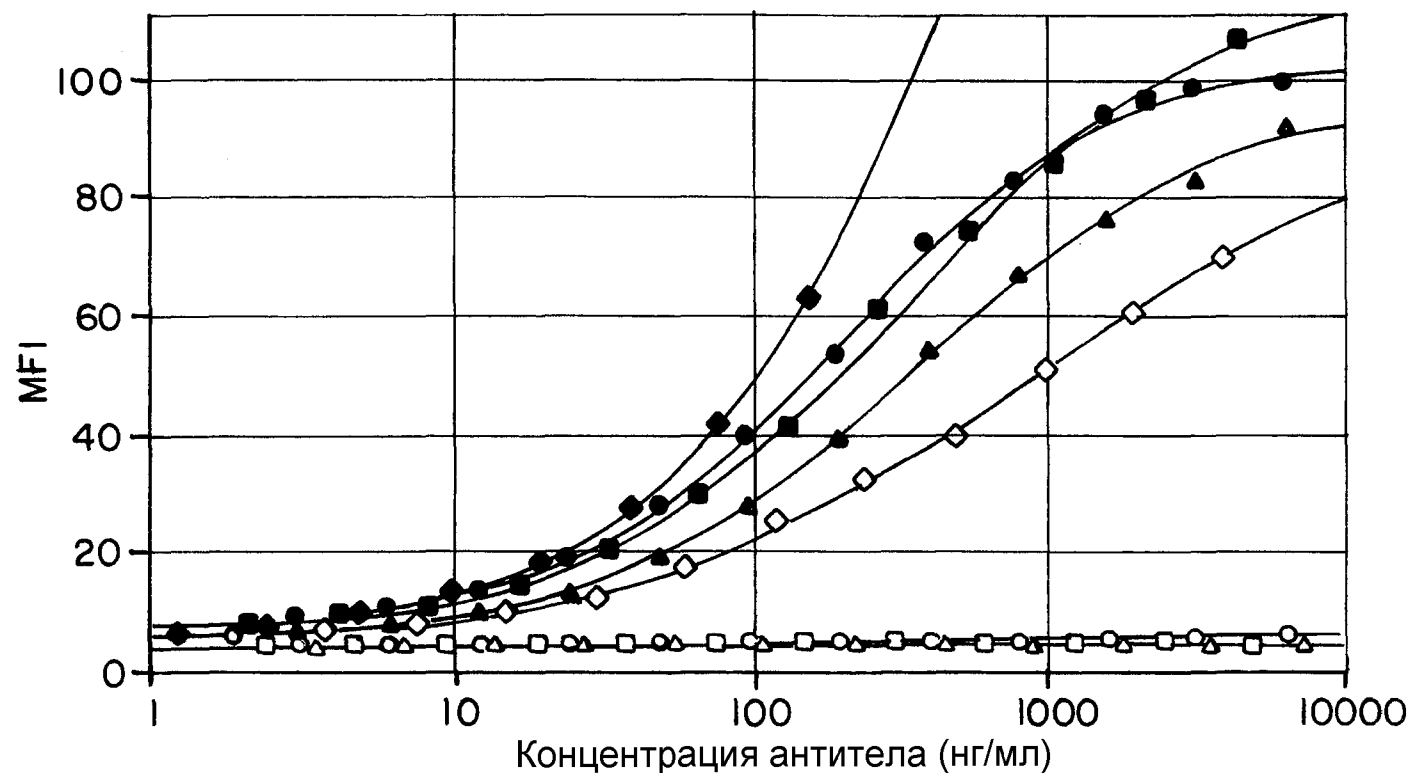
18. Композиция по любому из пп.15-17, где домен VH идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24, и домен VL идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23.

19. Композиция по любому из пп.14-16, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

По доверенности

ФИГ.1





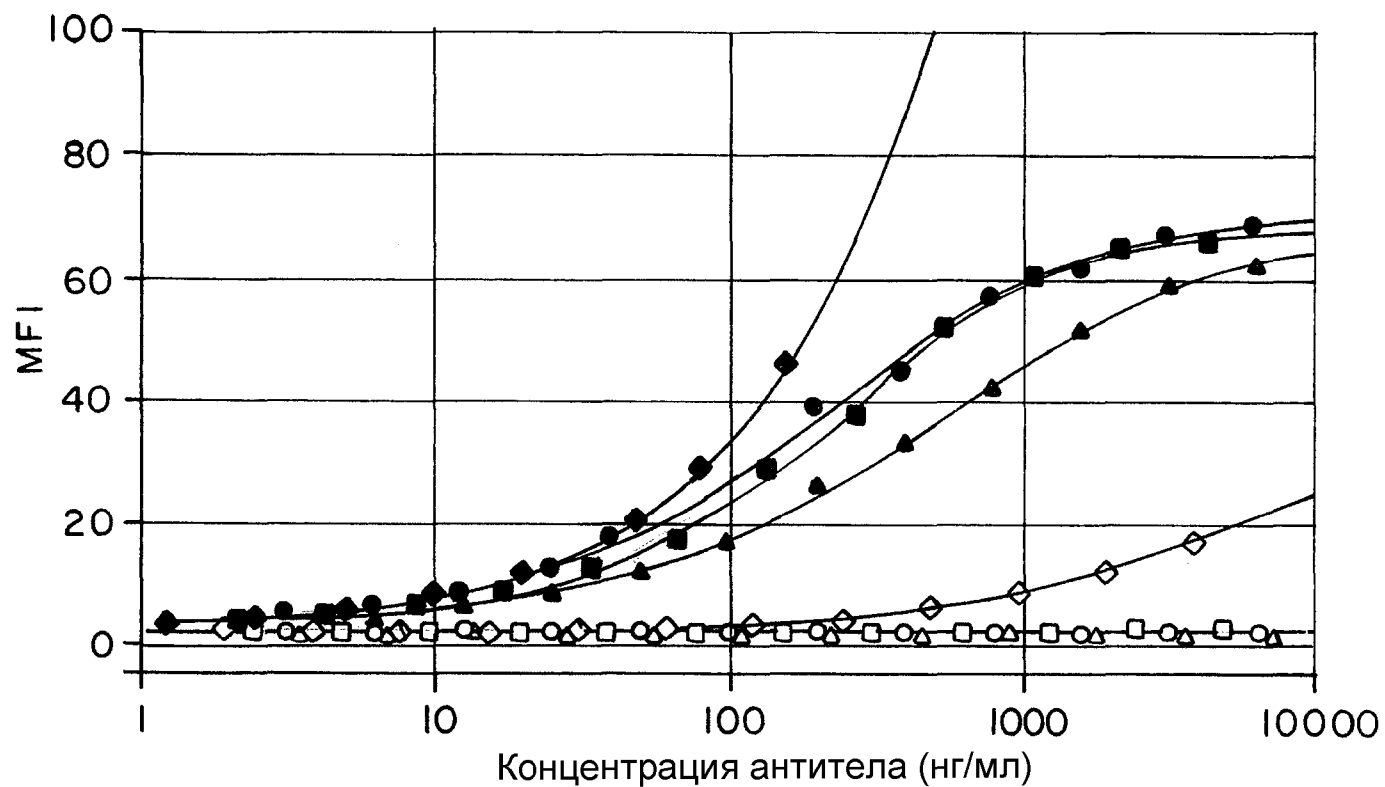
ФИГ.2

2/63

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

- L1/H0 (y1740/y1742) (A: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- L1/H1 (y1740/y1743) (B: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- △ L1/H2 (y1740/y1744) (C: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- ◇ L1/H3 (y1740/y1745) (D: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- L1/H4 (y1740/y1746) (E: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- L1/H5 (y1740/y1747) (F: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- ▲ L1/H6 (y1740/y1748) (G: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- ◆ chi24F4 (y1671/y1672) (H: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)

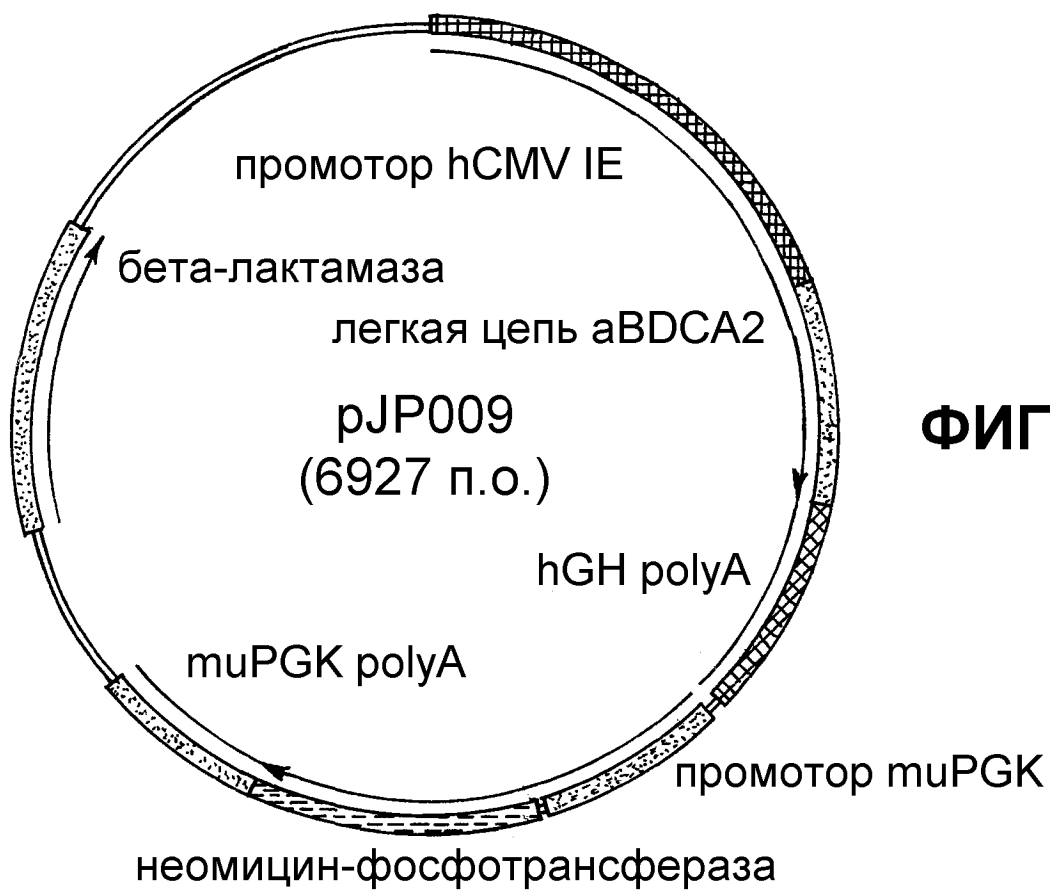
A	B	C	D	R ²
4,32	0,366	1,3E+18	2,91E+05	0,979
-2,08E+08	0,784	1,74E-11	4,7	0,498
3,85	0,622	984	97,2	0,999
8,32	1	200	102	0,999
6,16	0,839	309	115	0,998
5,67	0,857	359	96,6	0,999
4,51	0,716	3,52E+03	599	1



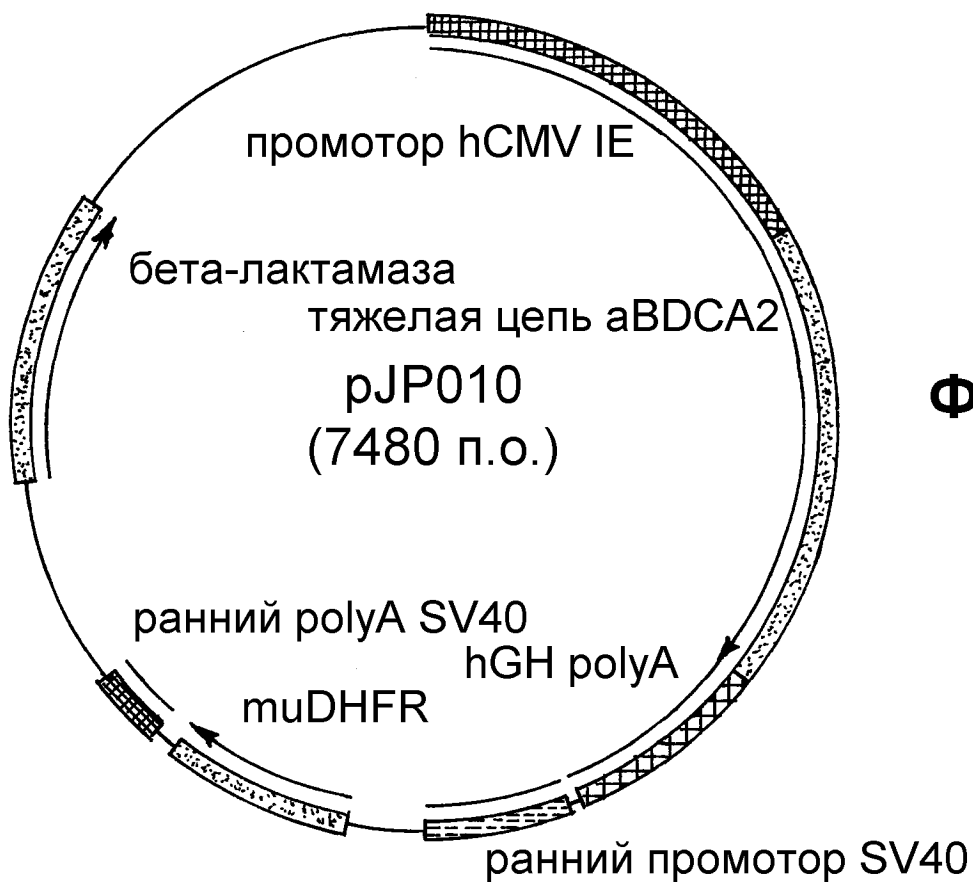
ФИГ.3

3/63

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



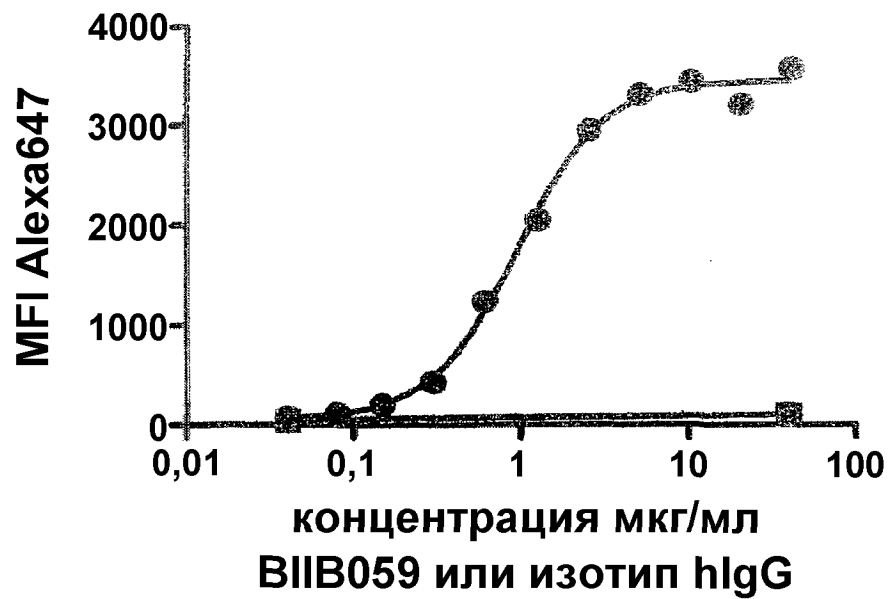
ФИГ.4



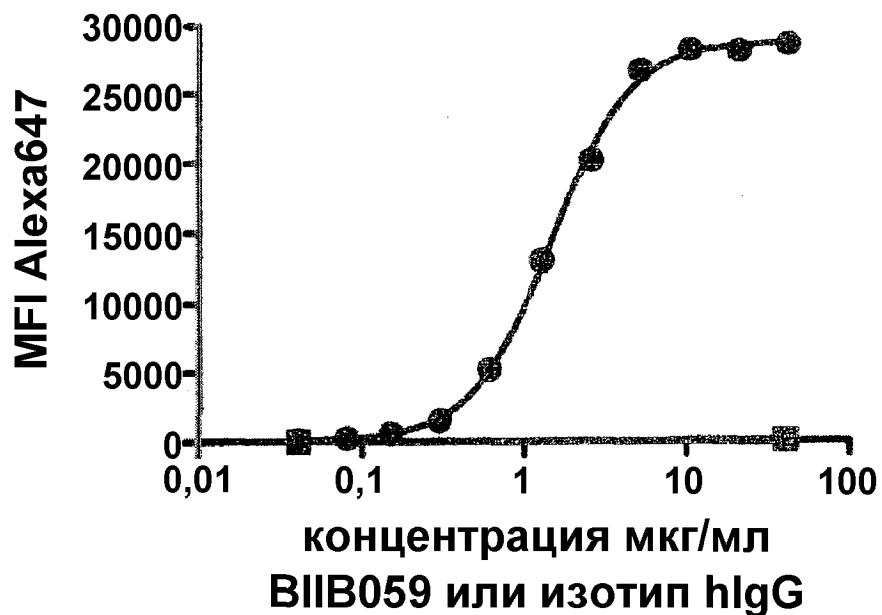
ФИГ.5

ФИГ.6А

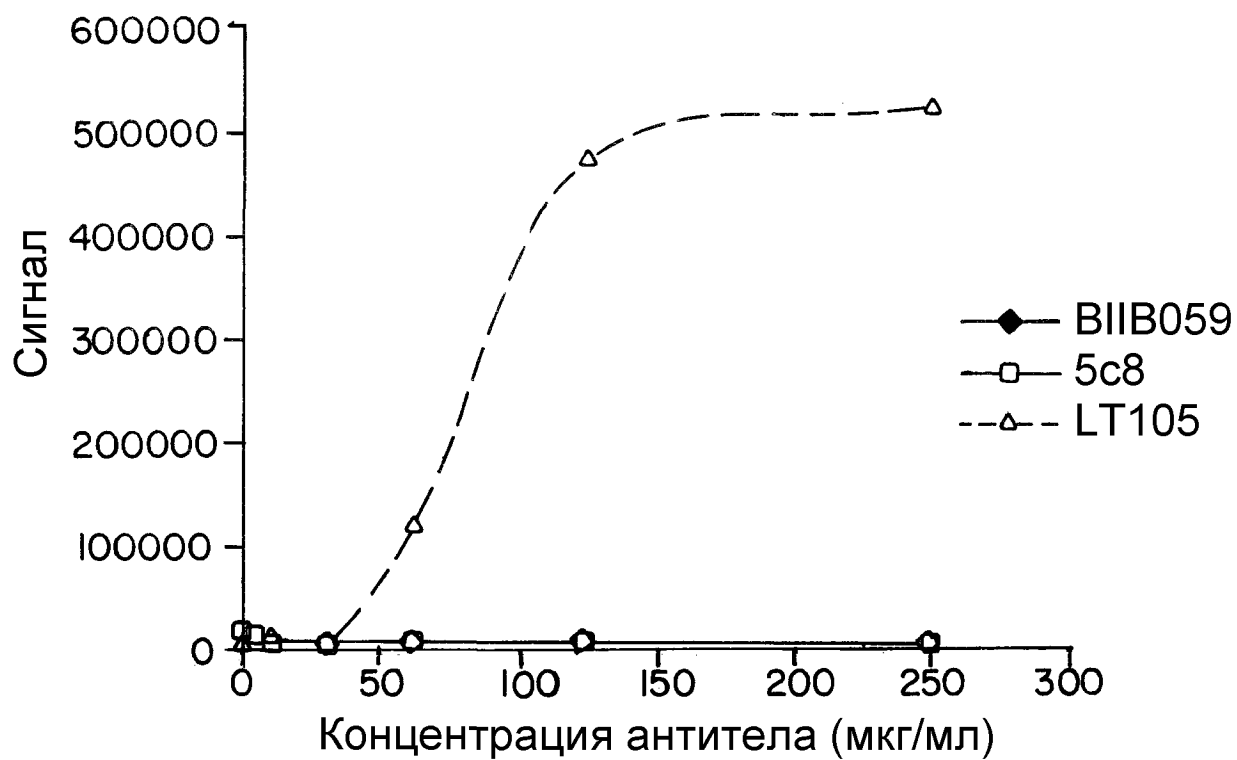
цельная кровь обезьян циномолгус
BIIВ059 EC50=0,9442 мкг/мл

**ФИГ.6В**

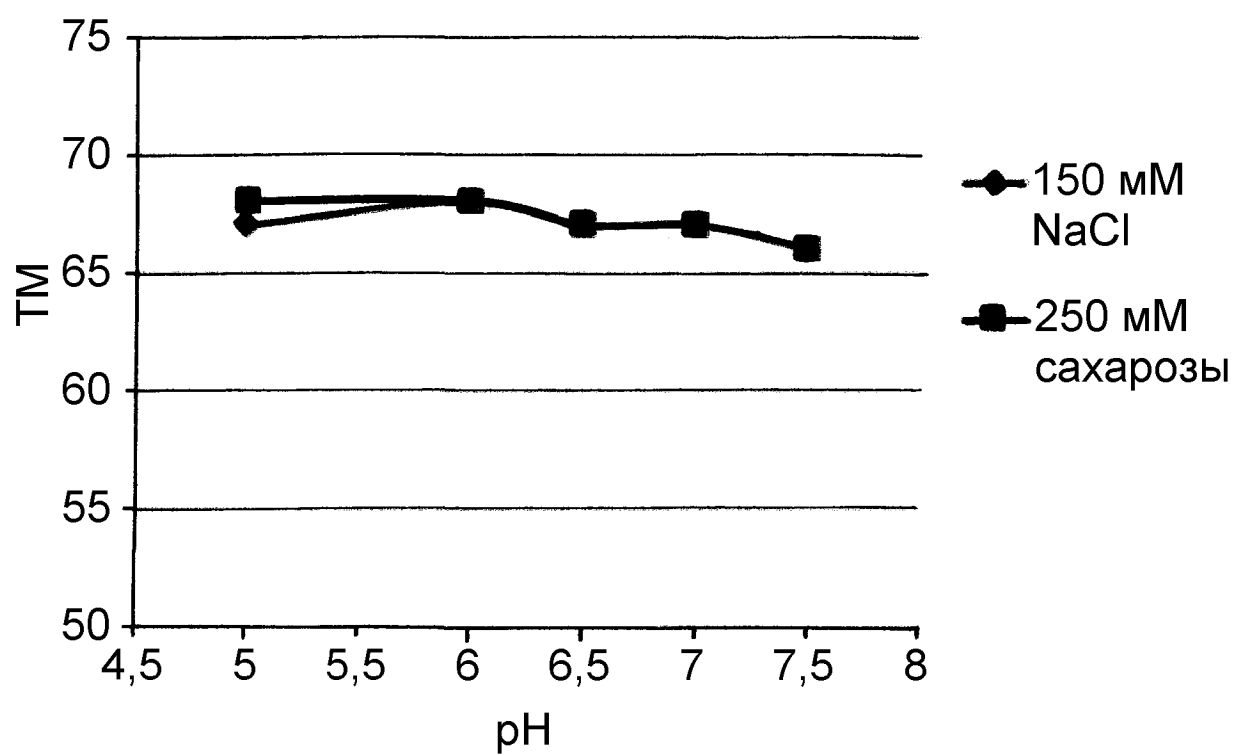
цельная кровь человека
BIIВ059 EC50=1,437 мкг/мл



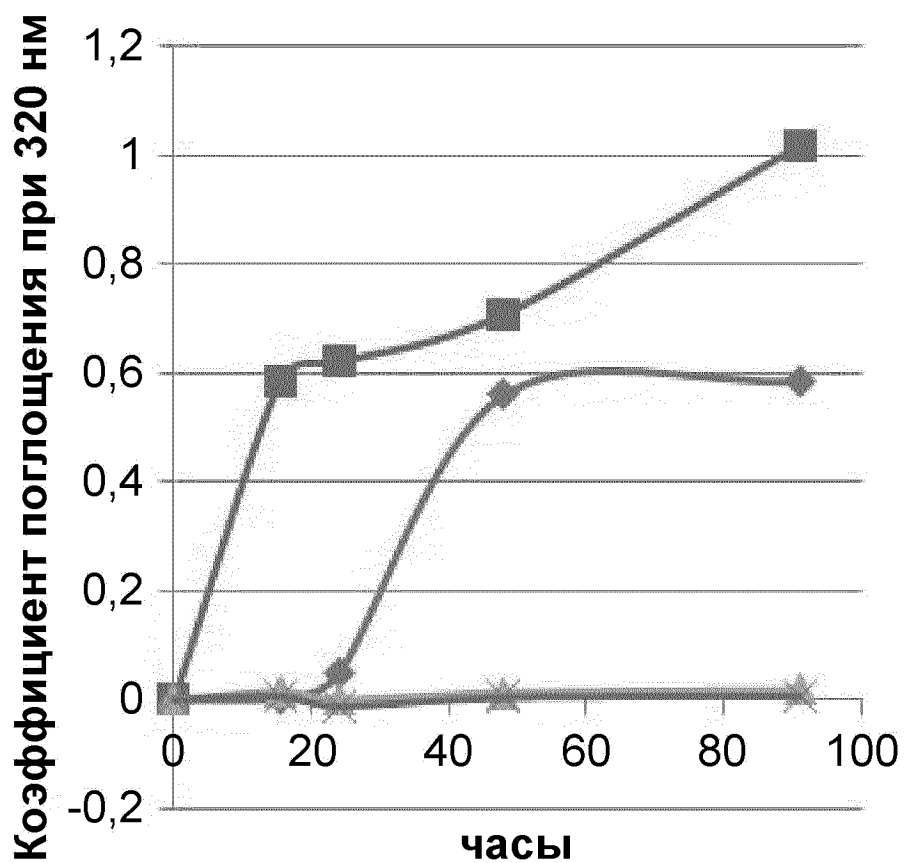
ФИГ.7



ФИГ.8



ФИГ.9

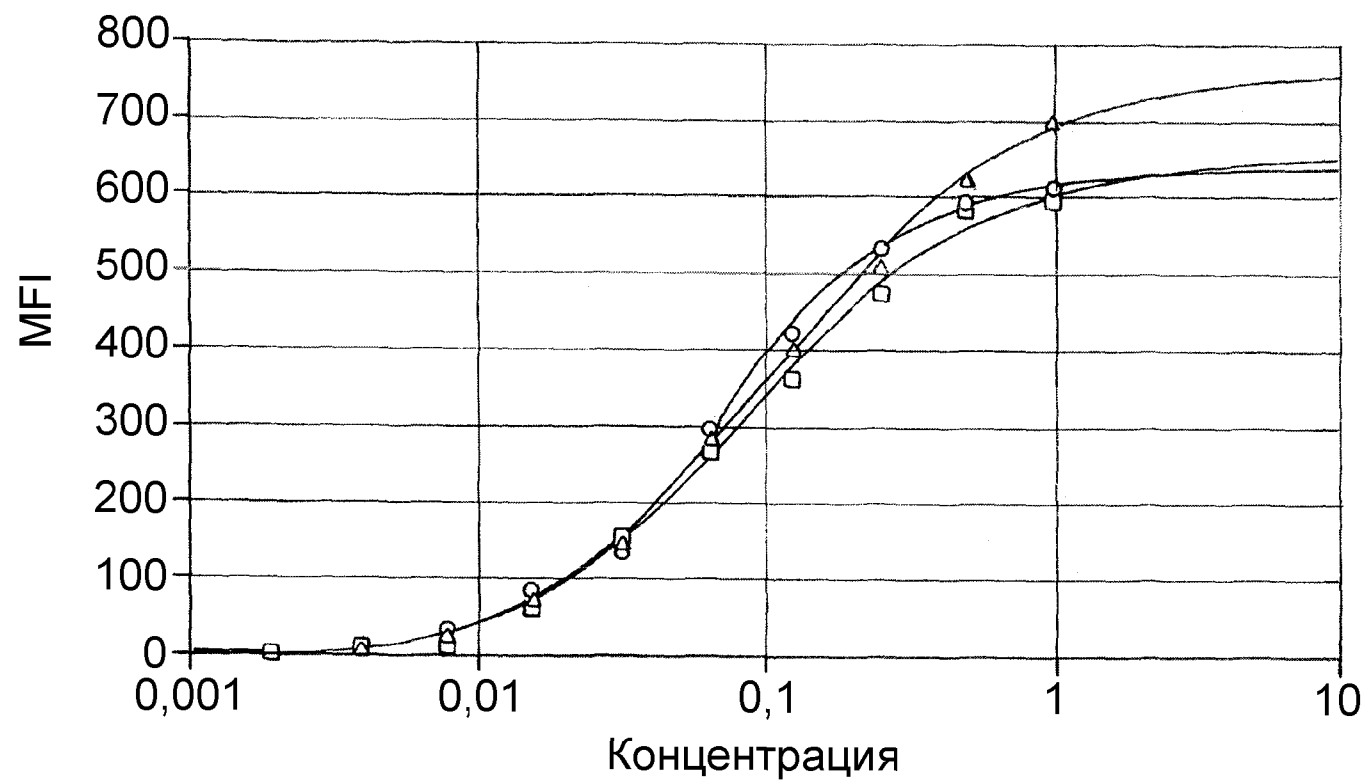


◆ BII B059 дикого типа IgG1

■ BII B059 агликозилированное IgG4/IgG1

★ BII B059 дикого типа IgG1 + Твин-80

✕ BII B059 агликозилированное IgG4/IgG1 + Твин-80



ФИГ.10

8/63

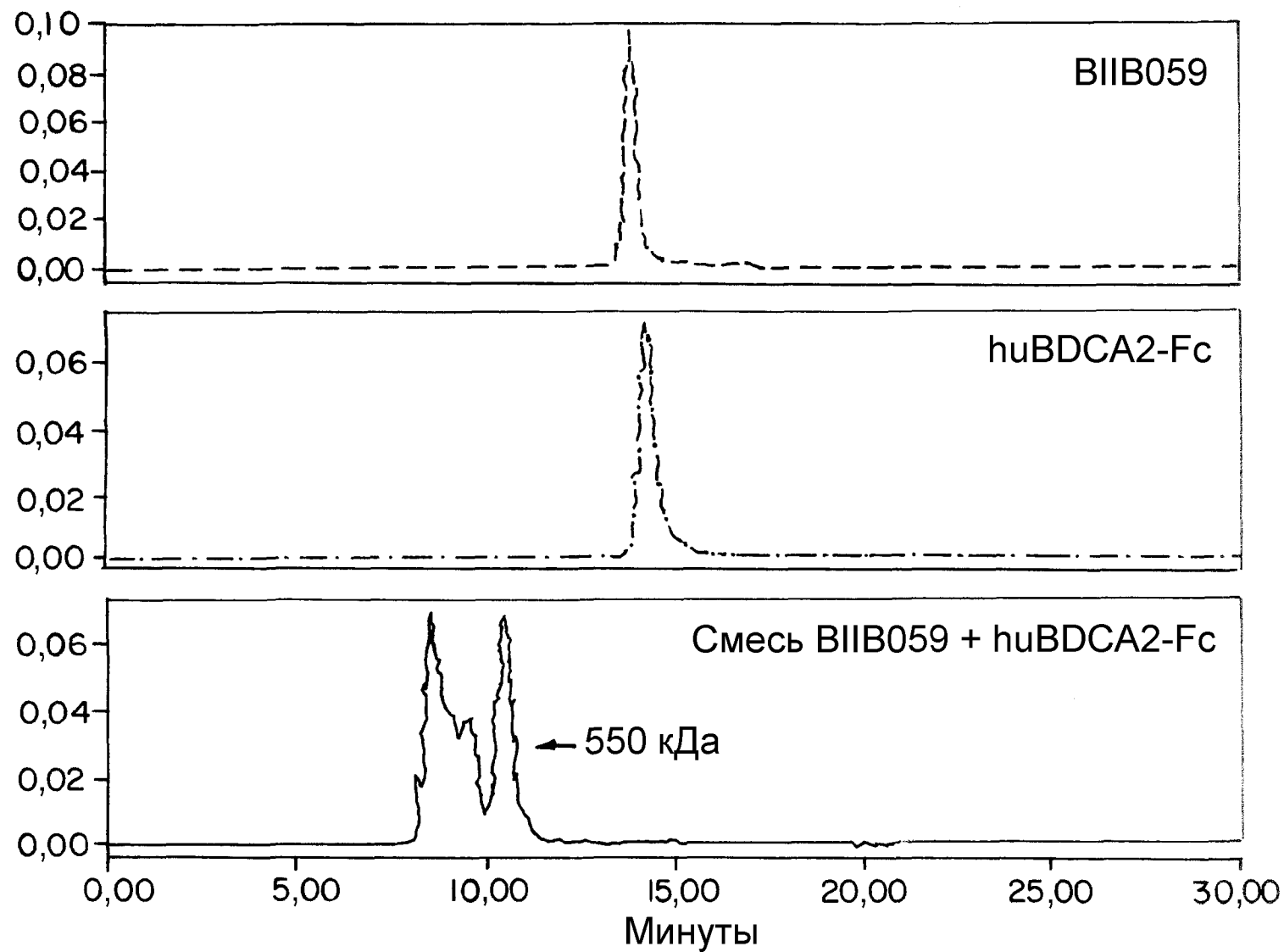
4-P FIT: $Y = (A - D)/(1 + (X/C)^B) + D$

○ E73 (E73 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ № 1: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)

□ K73 (K73 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ № 1: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)

△ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ (ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ № 1: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)

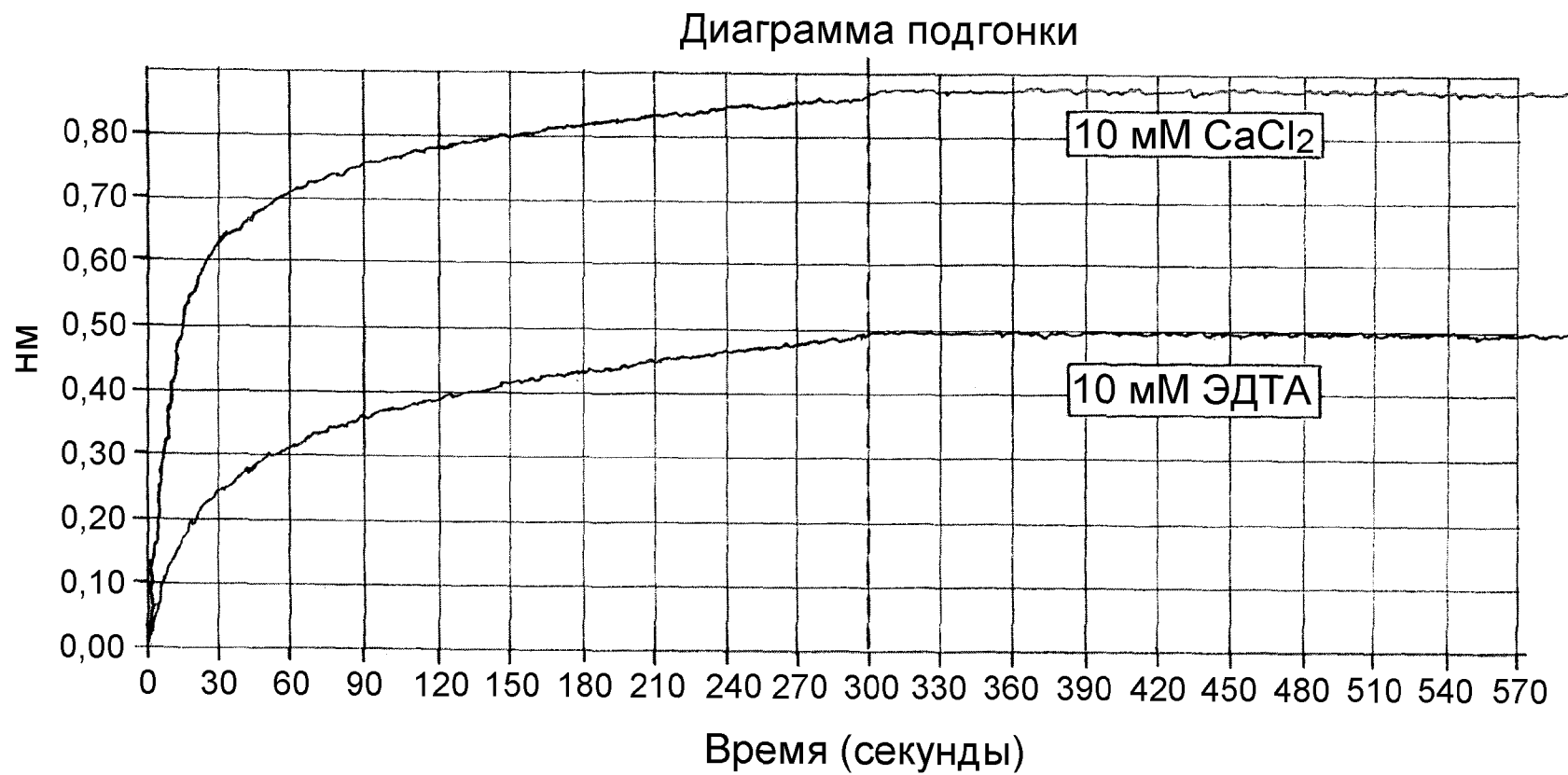
<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R^2</u>
3,363	1,363	0,073	630,796	0,999
-4,155	1,105	0,091	640,607	0,996
-5,044	1,058	0,114	757,368	0,998



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

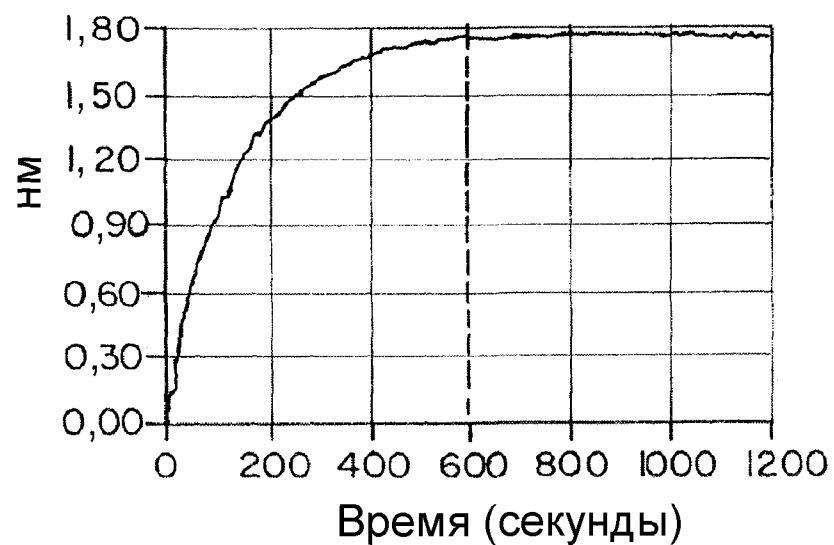
ФИГ. 11

ФИГ.12



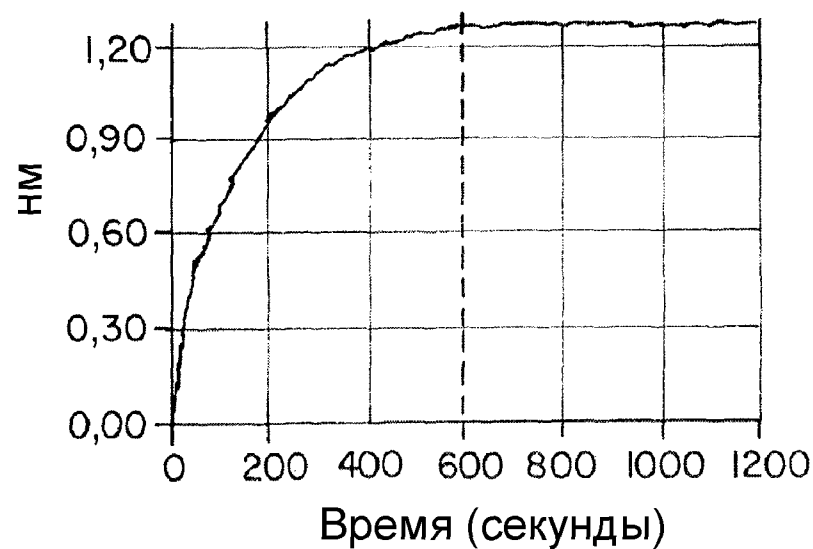
ФИГ.13

Расположение датчика: В12 -
по локализации ассоциированного (образца)



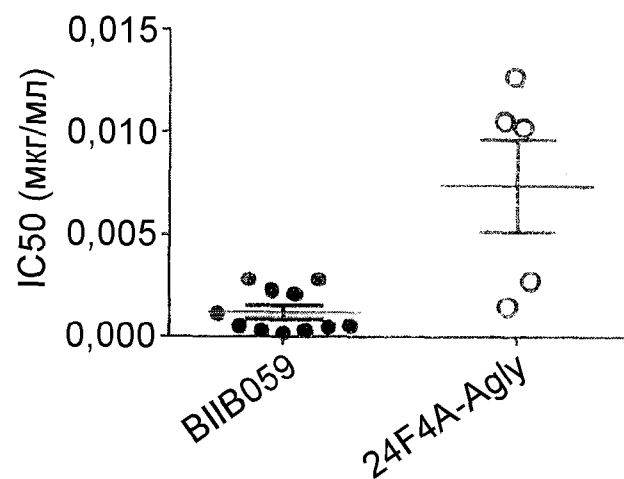
Человеческий BDCA2 ECD — В4

Расположение датчика: С12 -
по локализации ассоциированного (образца)



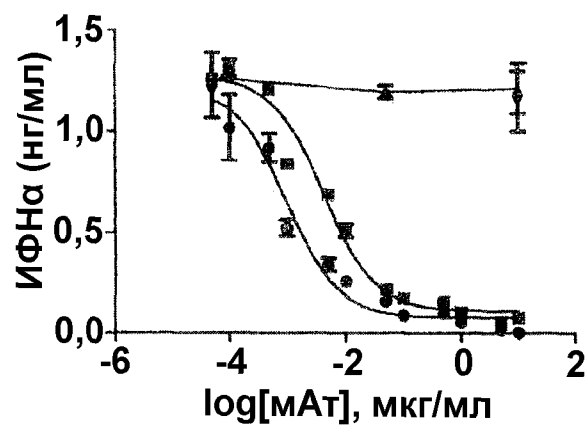
BDCA2 ECD обезьяны циномолгус — С4

ФИГ.14



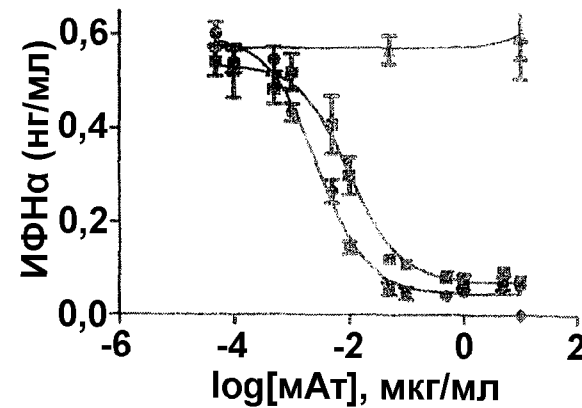
ФИГ.15А

Цельная кровь



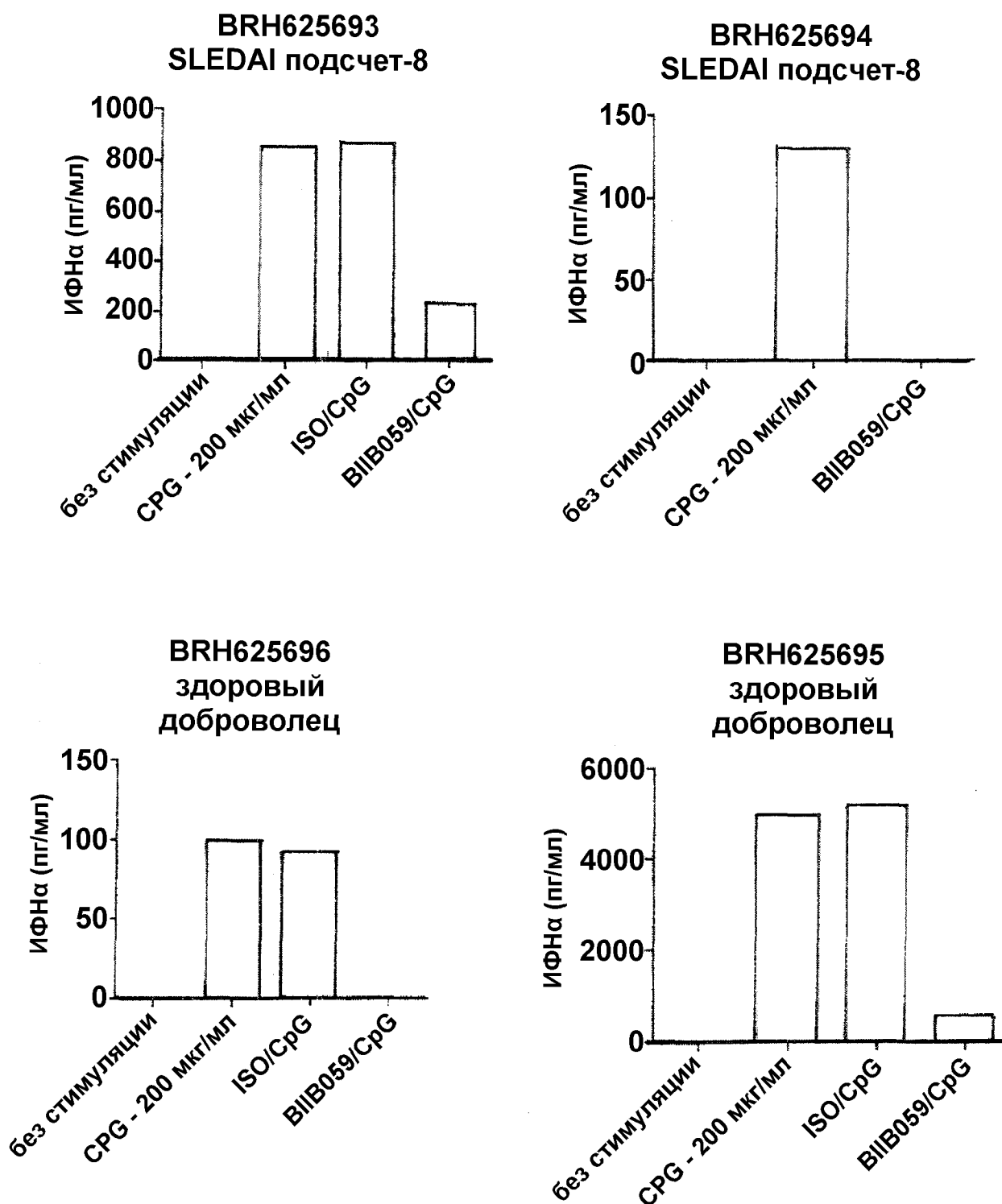
- CpG-A + BII059
- CpG-A + 24F4A Agly
- ▲ CpG-A + изотип
- ▼ CpG-A
- ◆ Не оценивали

PBMC

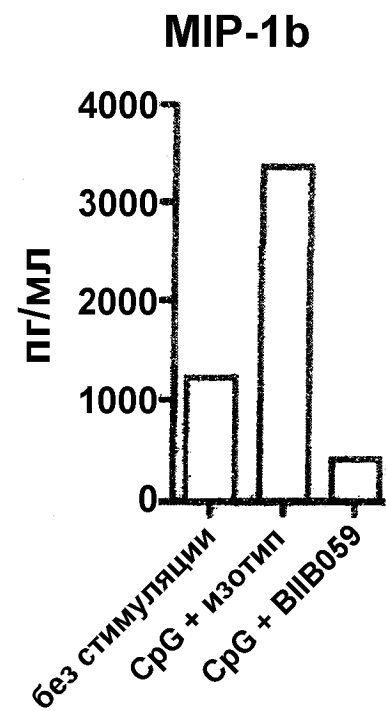
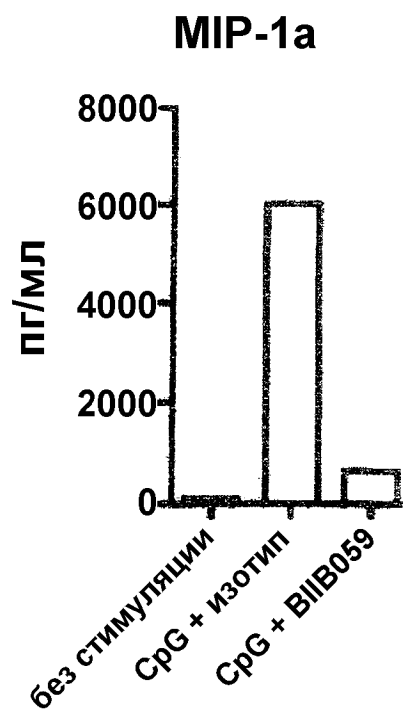
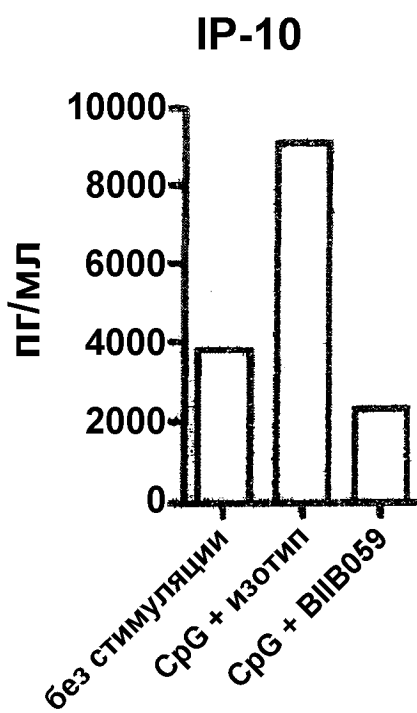
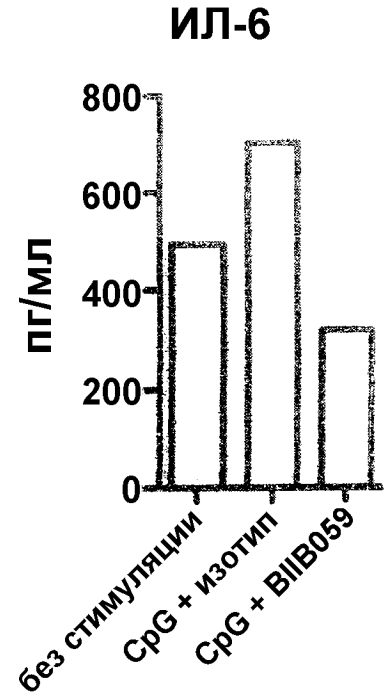
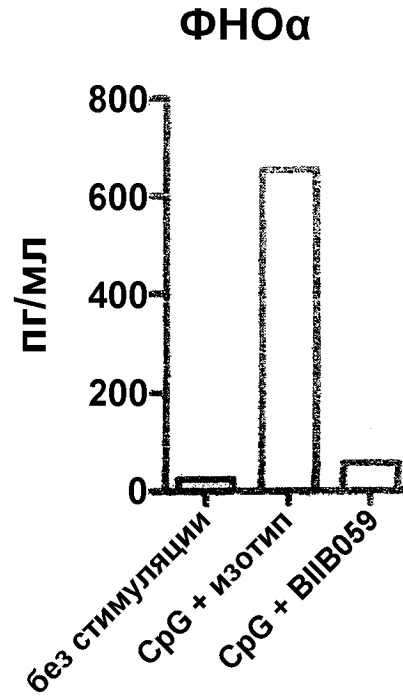
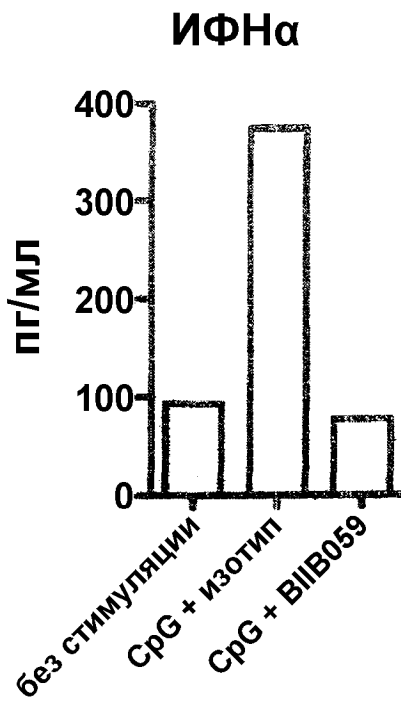


Вертикальные линии показывают SEM

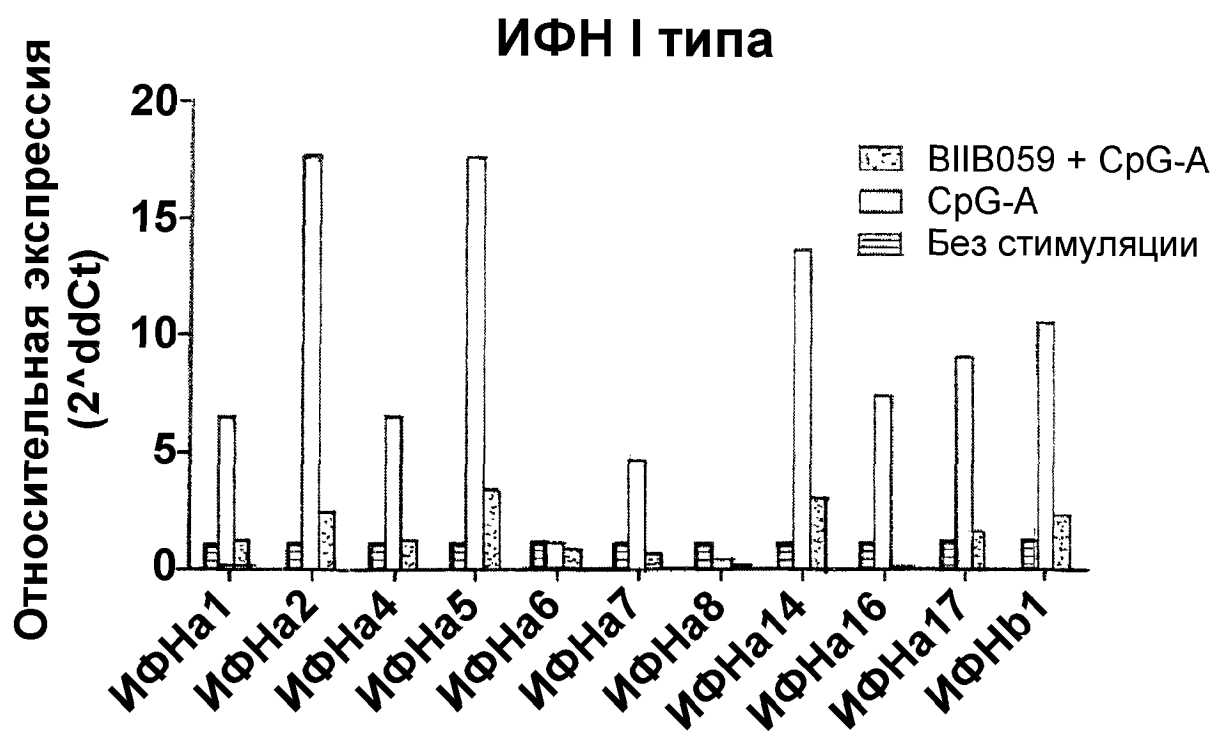
ФИГ.15В



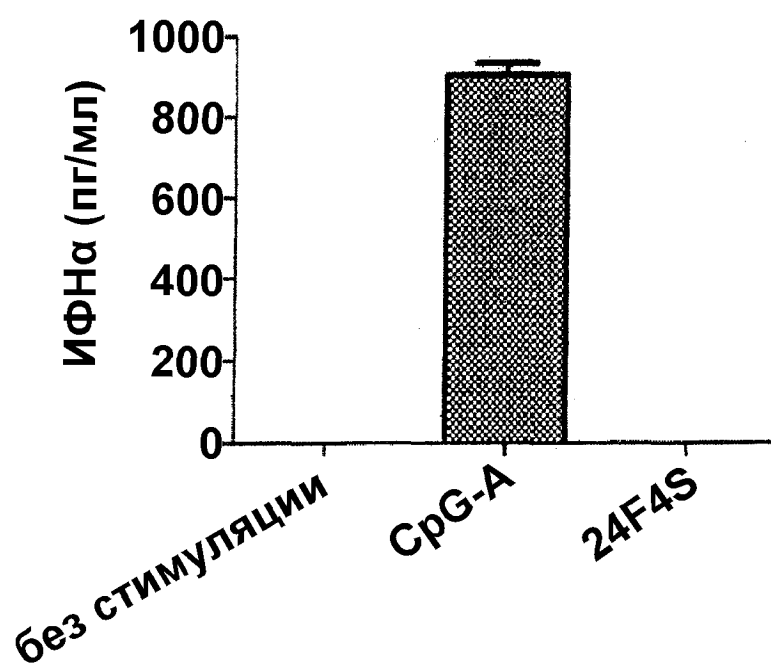
ФИГ.15С



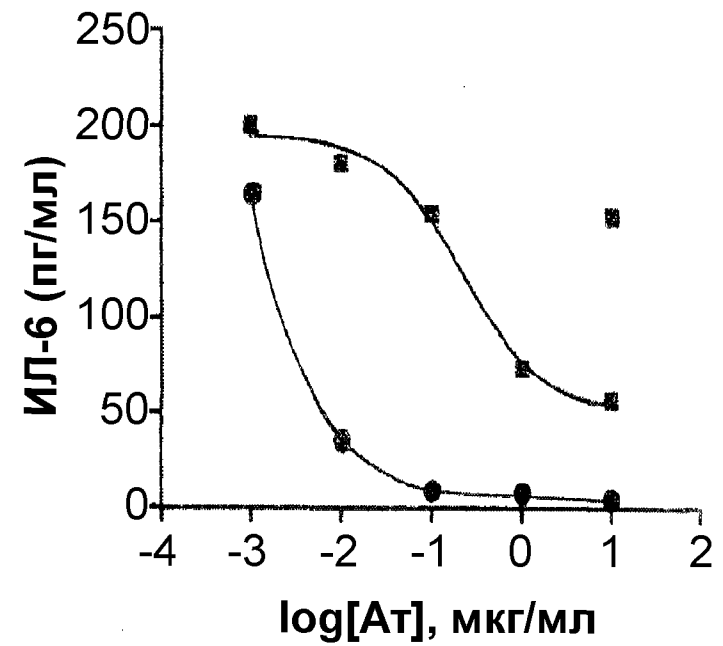
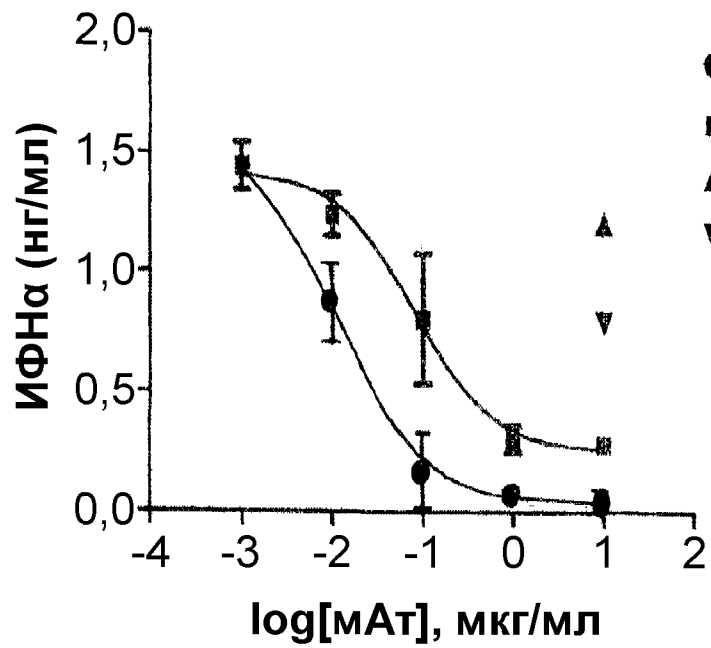
ФИГ.16



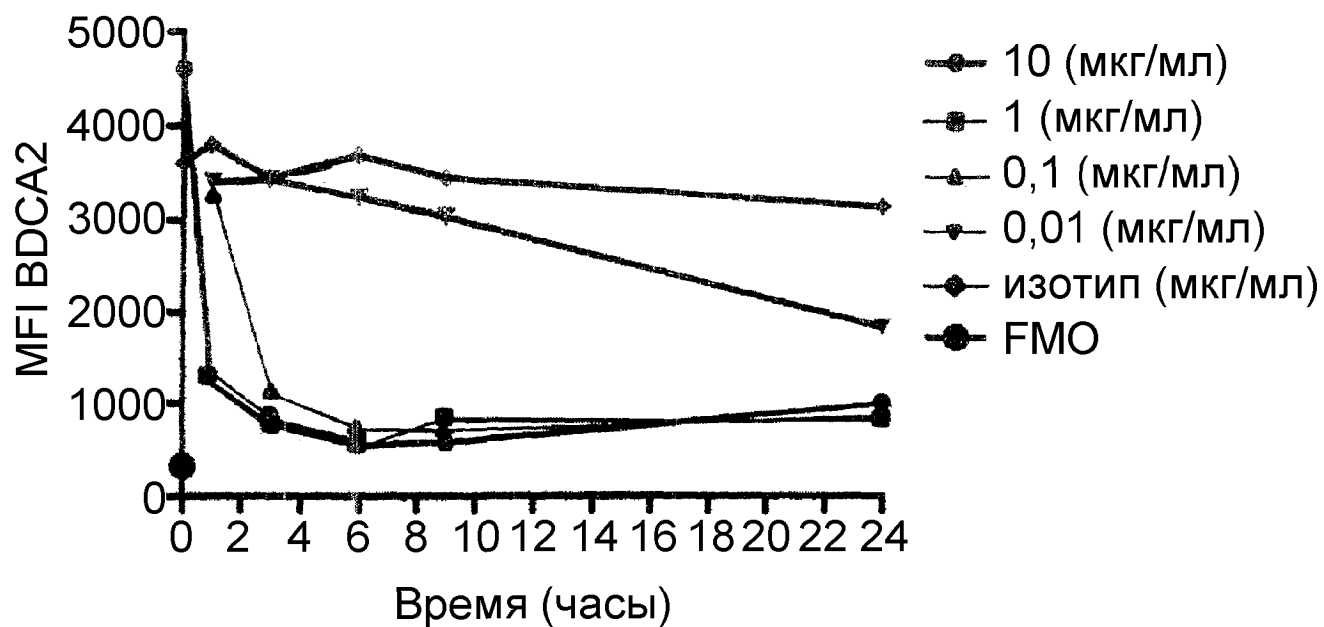
ФИГ.18



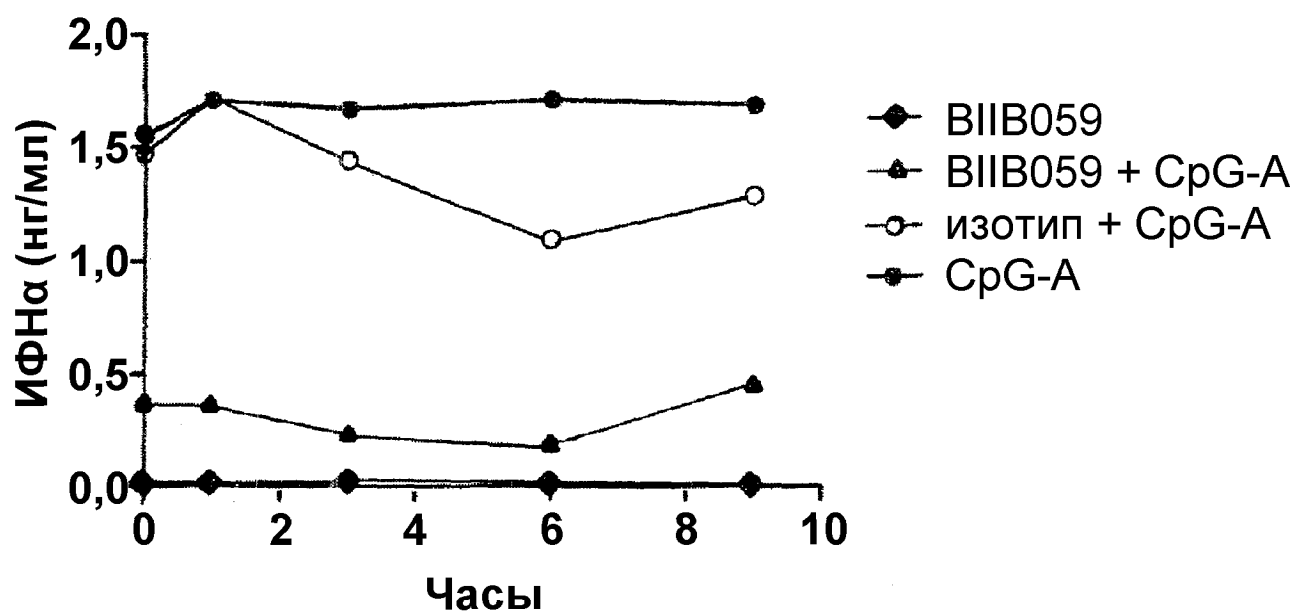
ФИГ.17



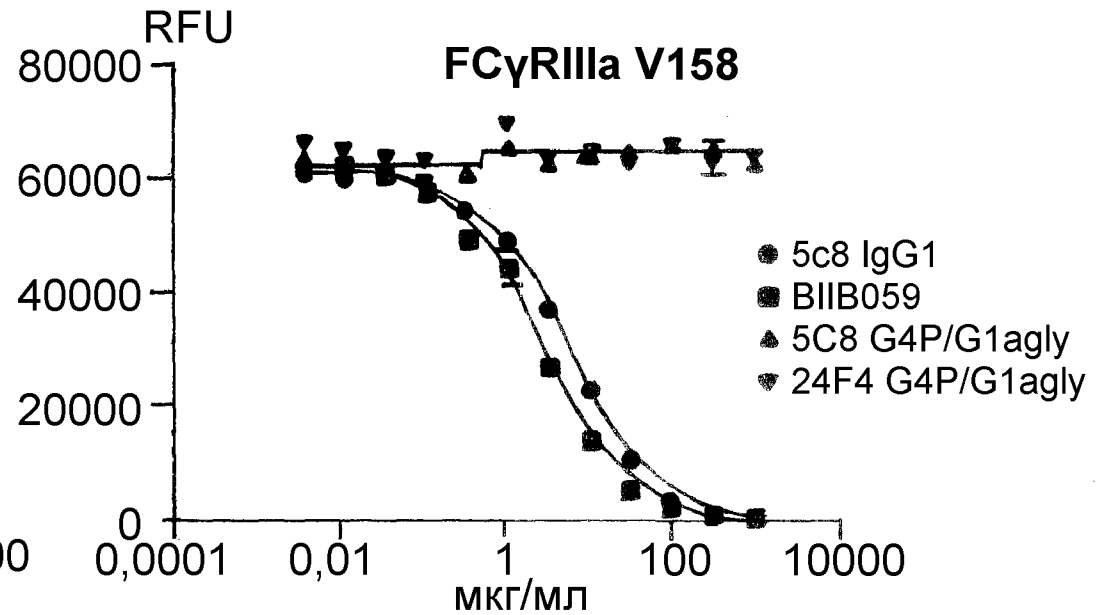
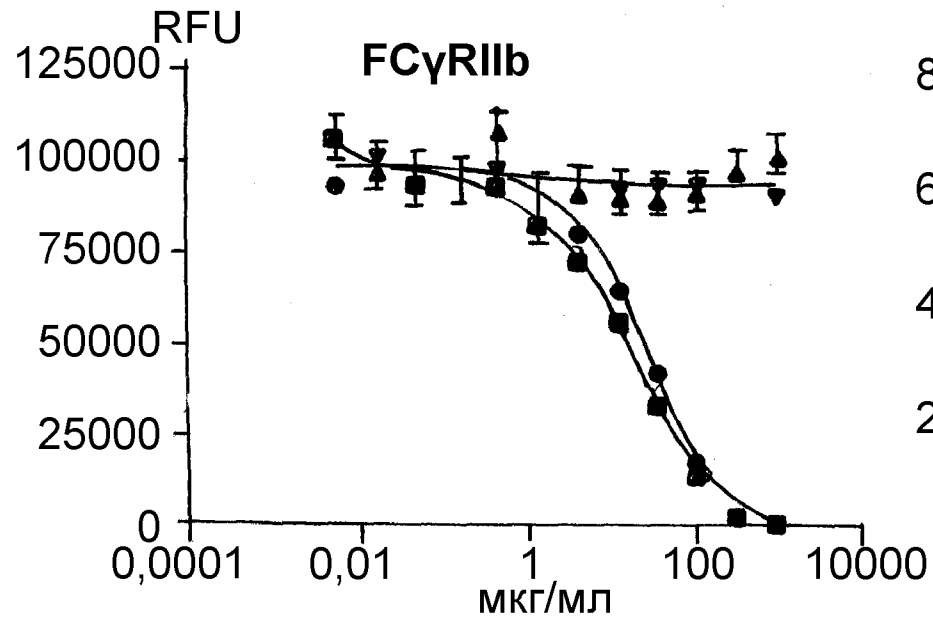
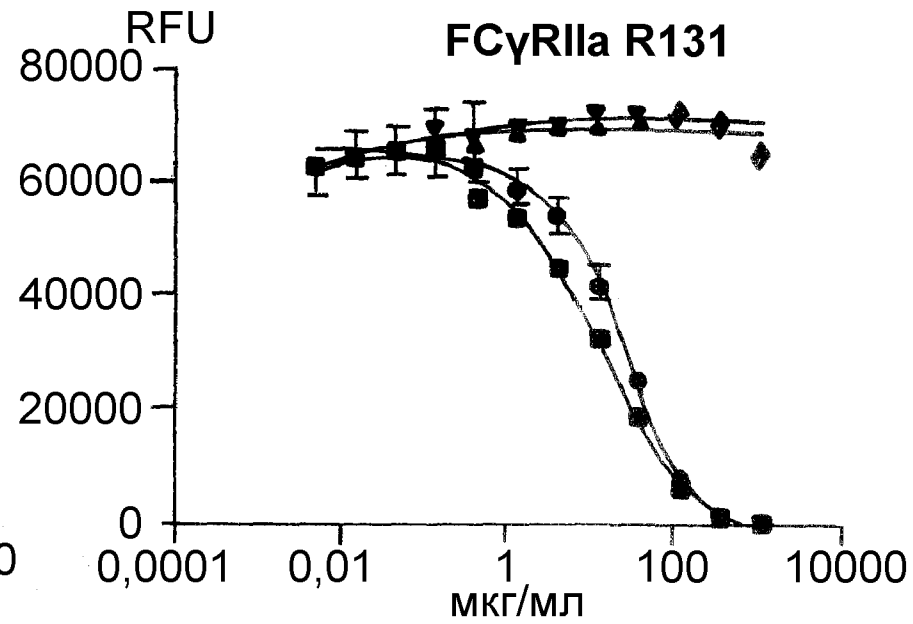
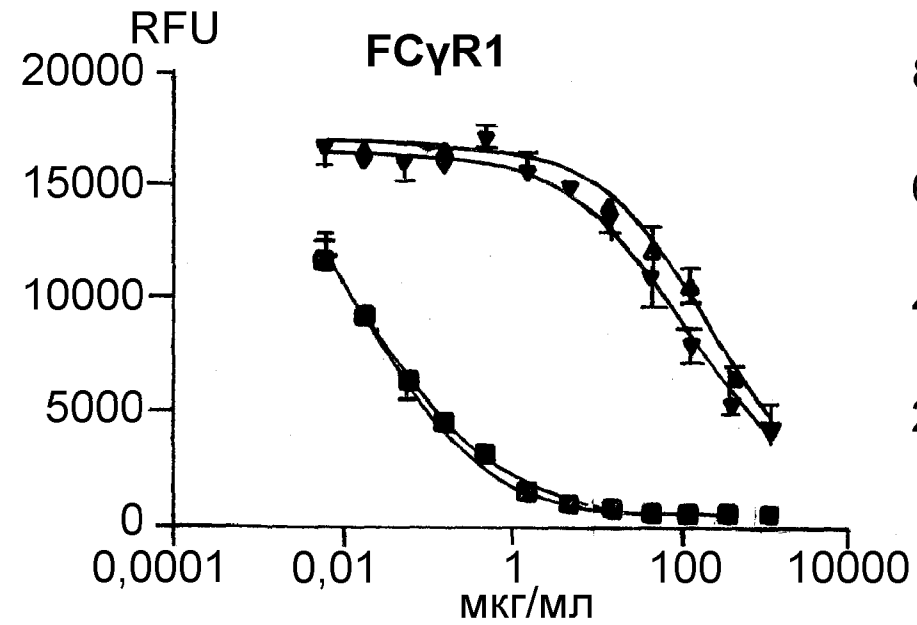
ФИГ.19А



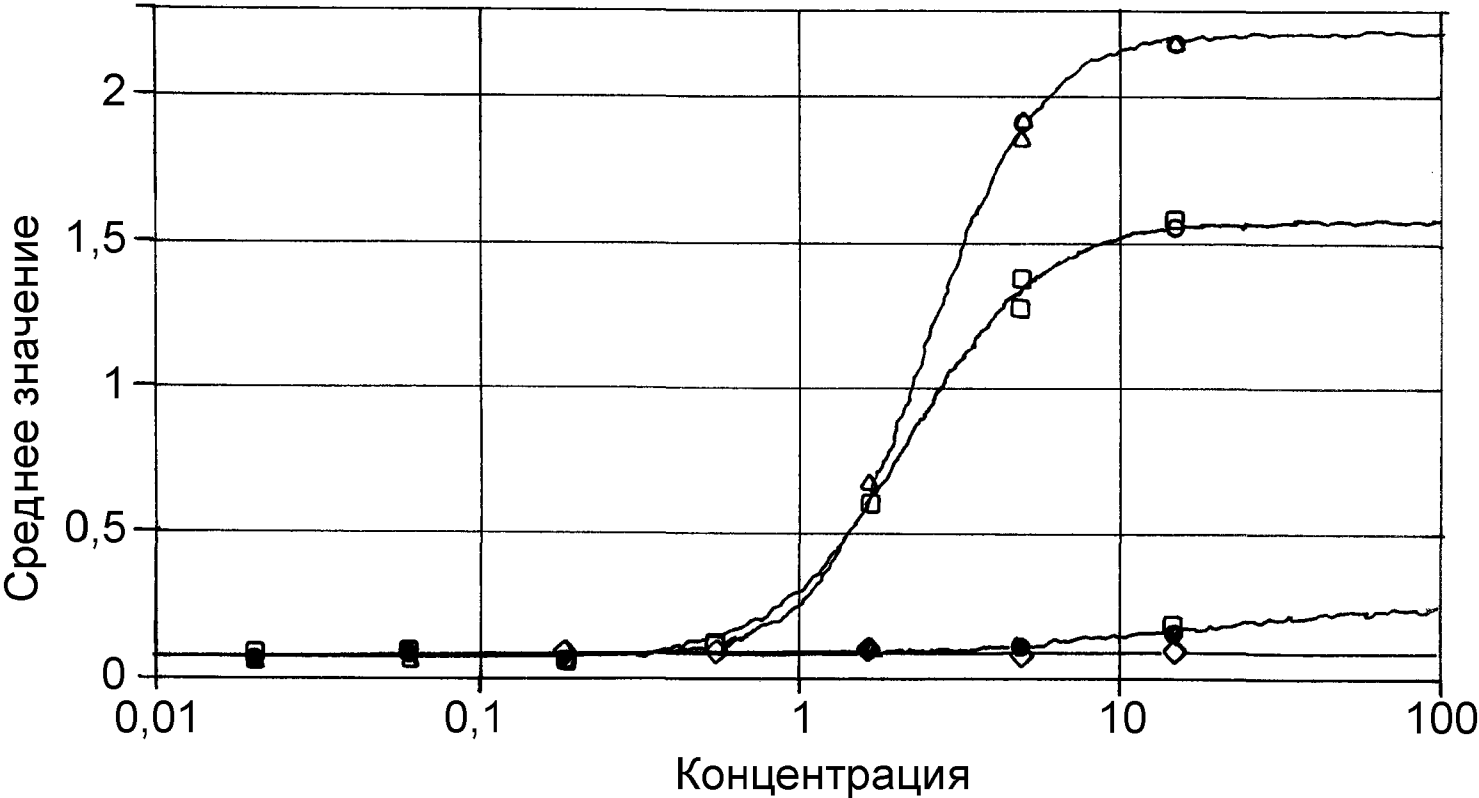
ФИГ.19В



ФИГ.20



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



ФИГ.21

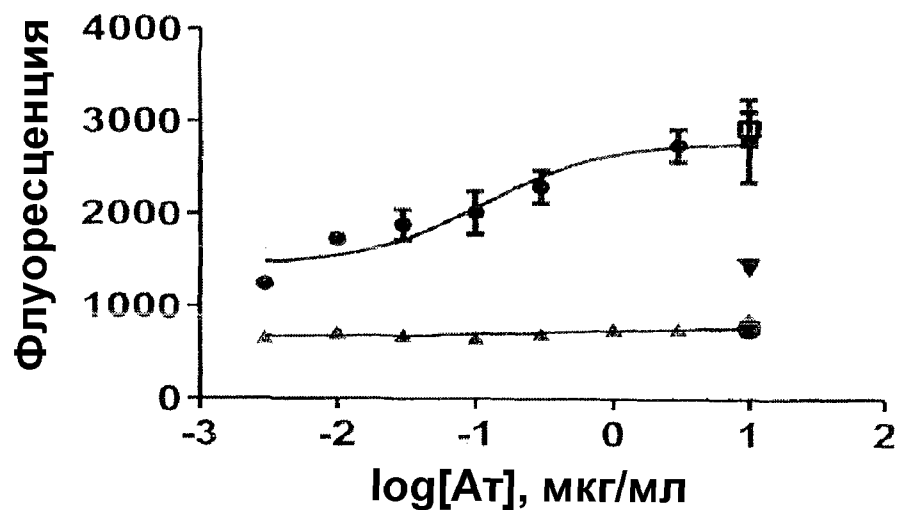
19/63

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

- STD (СТАНДАРТЫ: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДНЕГО ЗНАЧЕНИЯ)
- ГРАФИК № 1 (5с8 G1 ДИКОГО ТИПА: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- △ ГРАФИК № 2 (BII059 G1 ДИКОГО ТИПА: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- ◇ ГРАФИК № 3 (5с8 G4.P/G1 AGLY: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)
- ГРАФИК № 4 (24F4A G4.P/G1 AGLY: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)

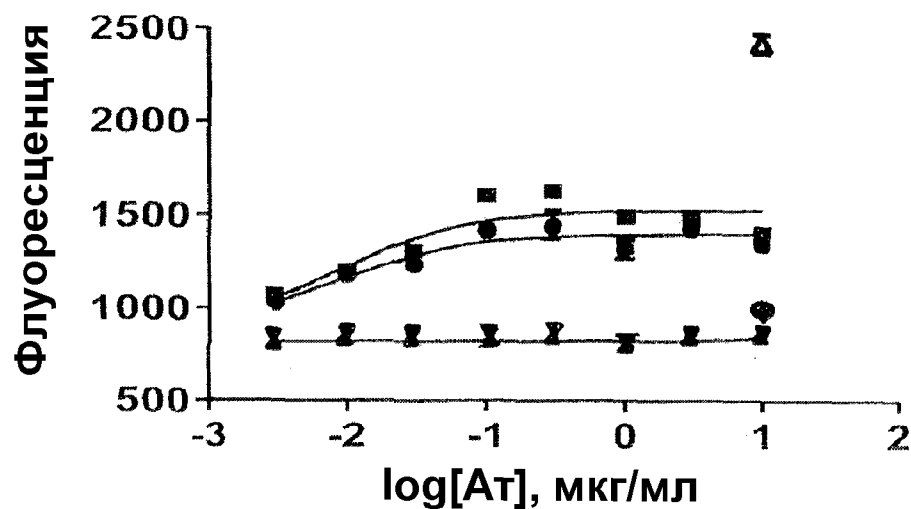
<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R^2</u>
*** НЕТ ДОСТУПНЫХ ДАННЫХ ***				
0,06	2,093	2,215	1,573	0,997
0,061	2,527	2,502	2,212	1
0,06	41,873	0,062	0,09	0,735
0,067	0,974	17,136	0,277	0,9

ФИГ.22А



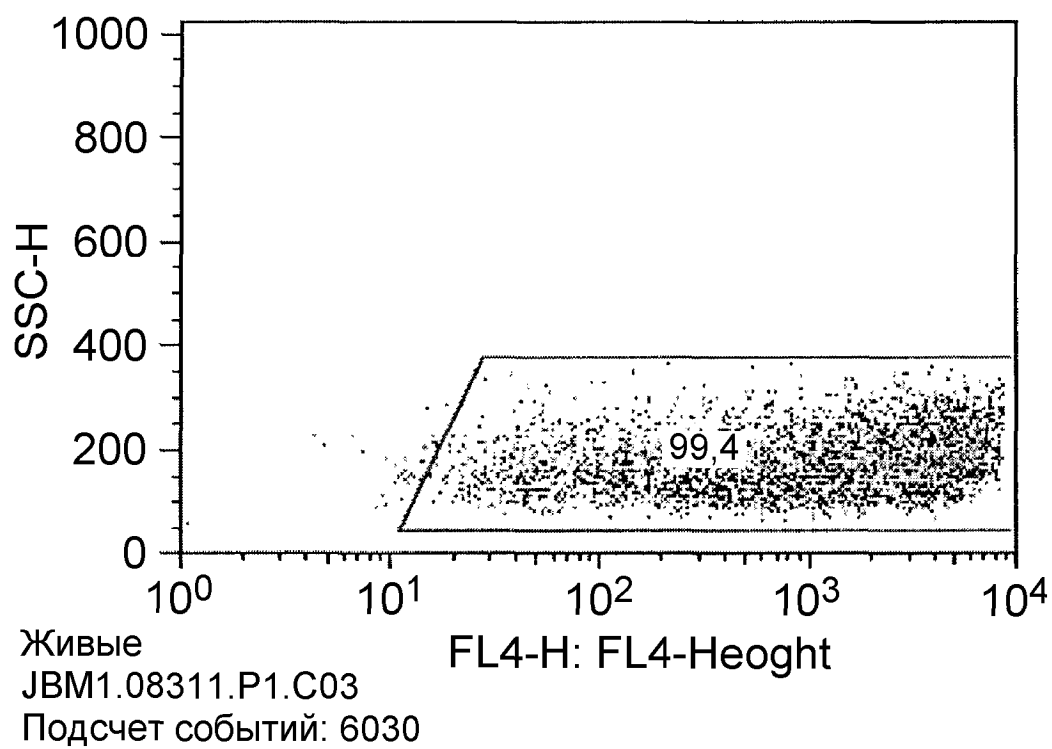
- 24F4S
- ▲ 24F4S Agly
- ▼ анти-LTb (LT105)
- ◆ контрольный изотип
- -контрольный носитель (без IgG)
- +контрольный носитель (Тритон X)

ФИГ.22В

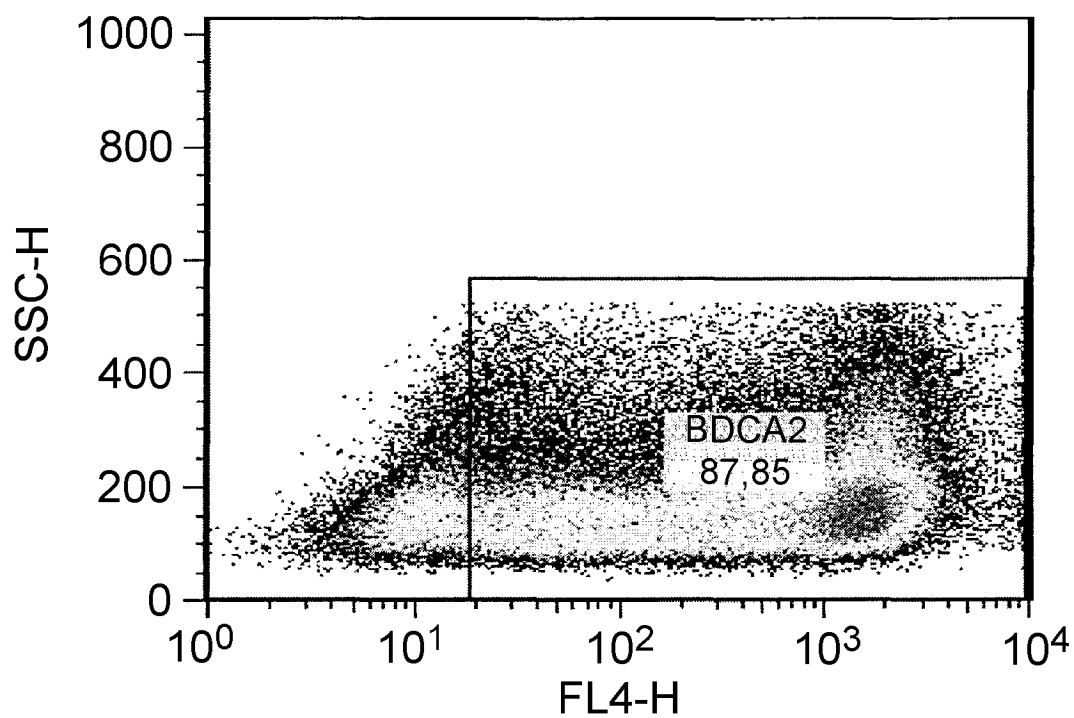


- B1B059
- 24F4S
- ▲ 24F4A agly
- ▼ 24F4S agly
- ◆ контрольный изотип
- -контрольный носитель (без IgG)
- △ +контрольный носитель (Тритон X)

ФИГ.22С

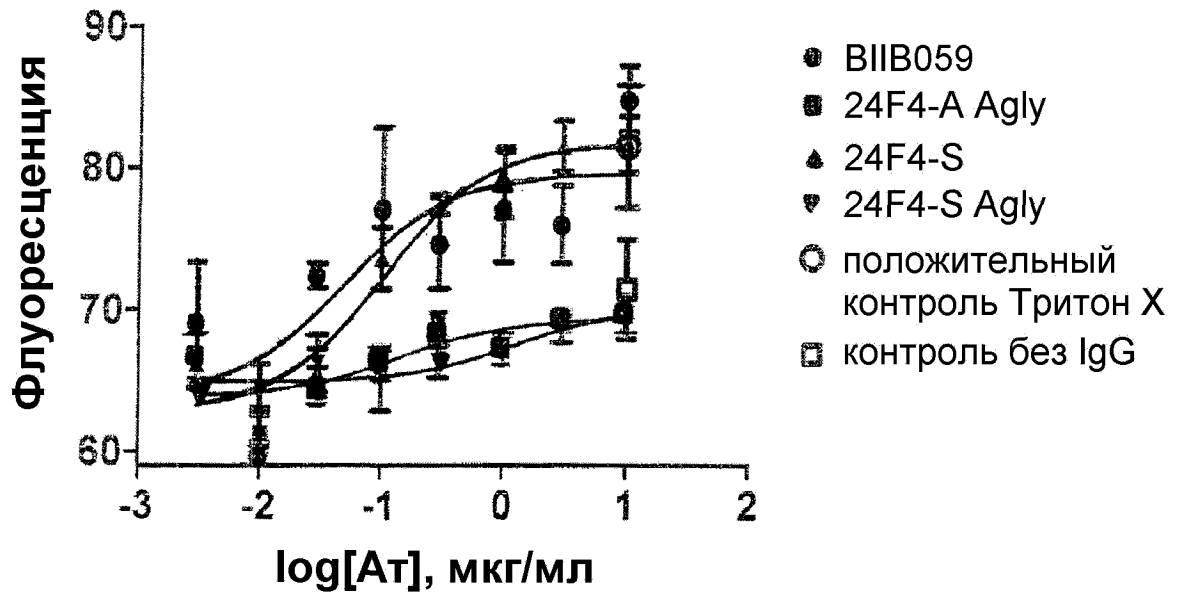


ФИГ.22D

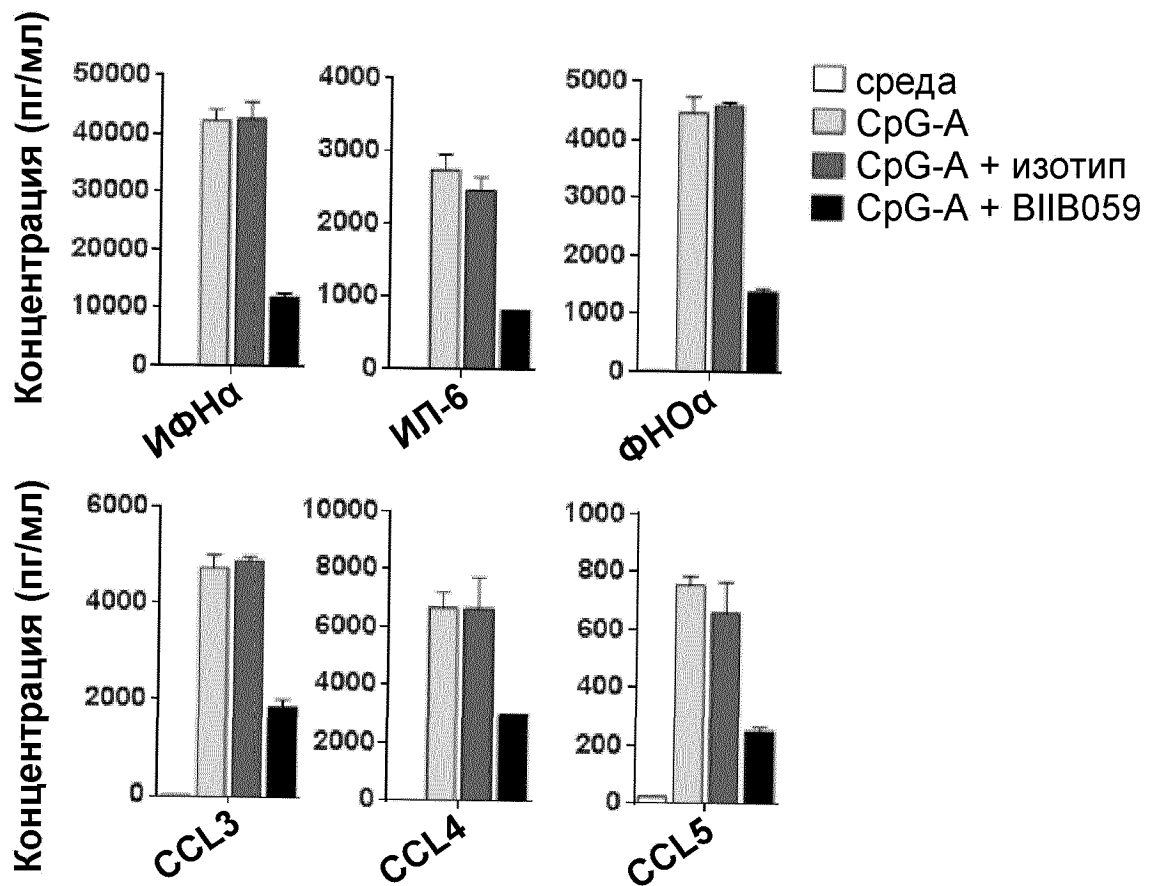


образец.003
Лимфоциты
93783

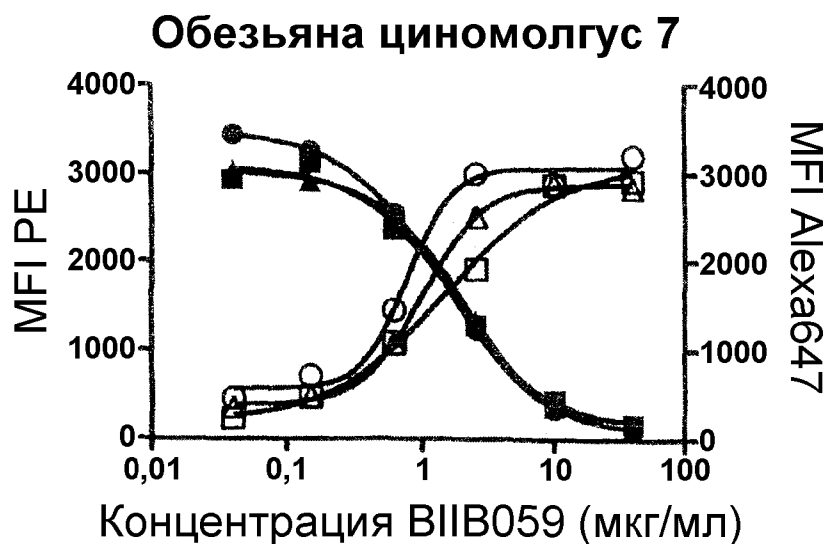
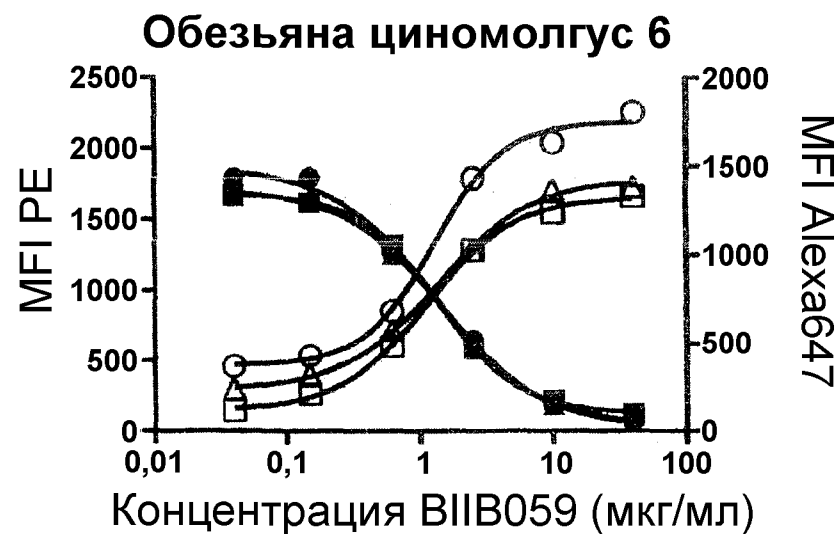
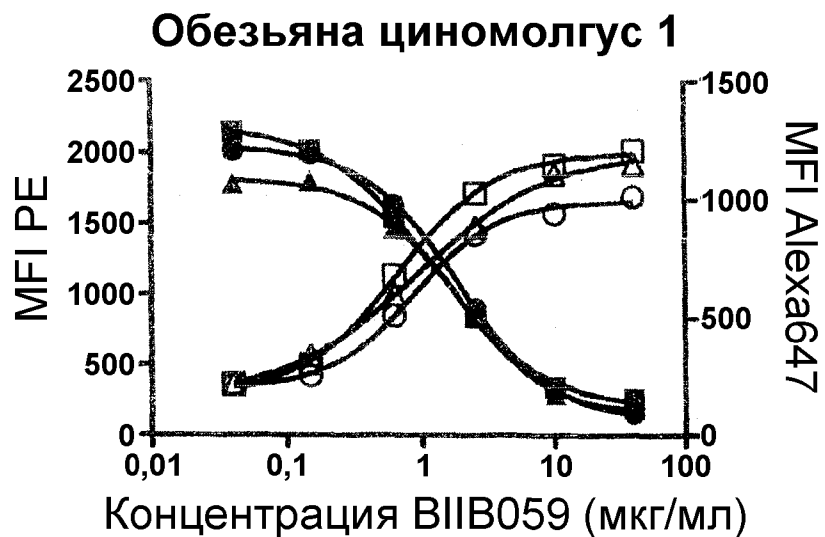
ФИГ.23



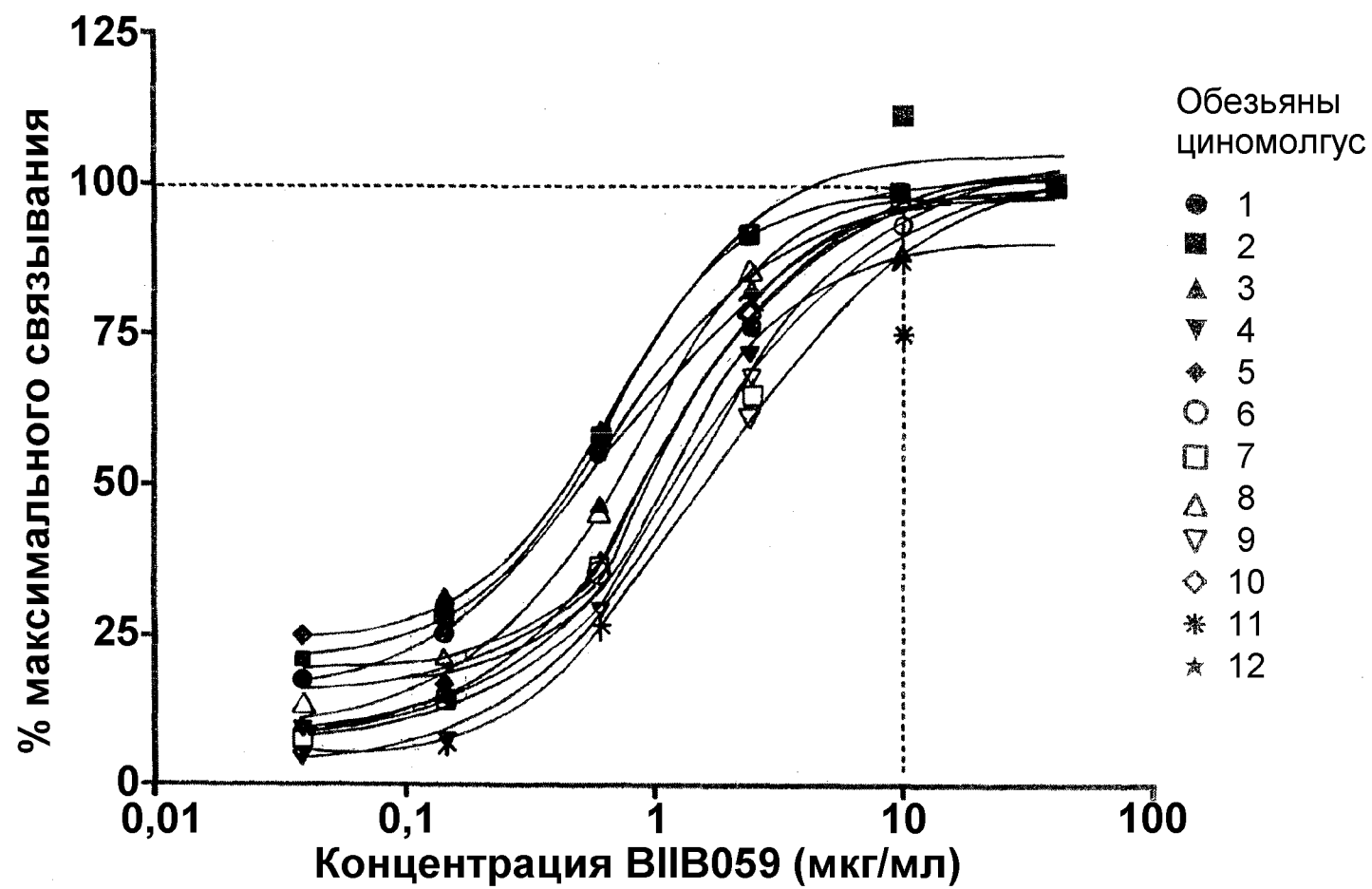
ФИГ.32



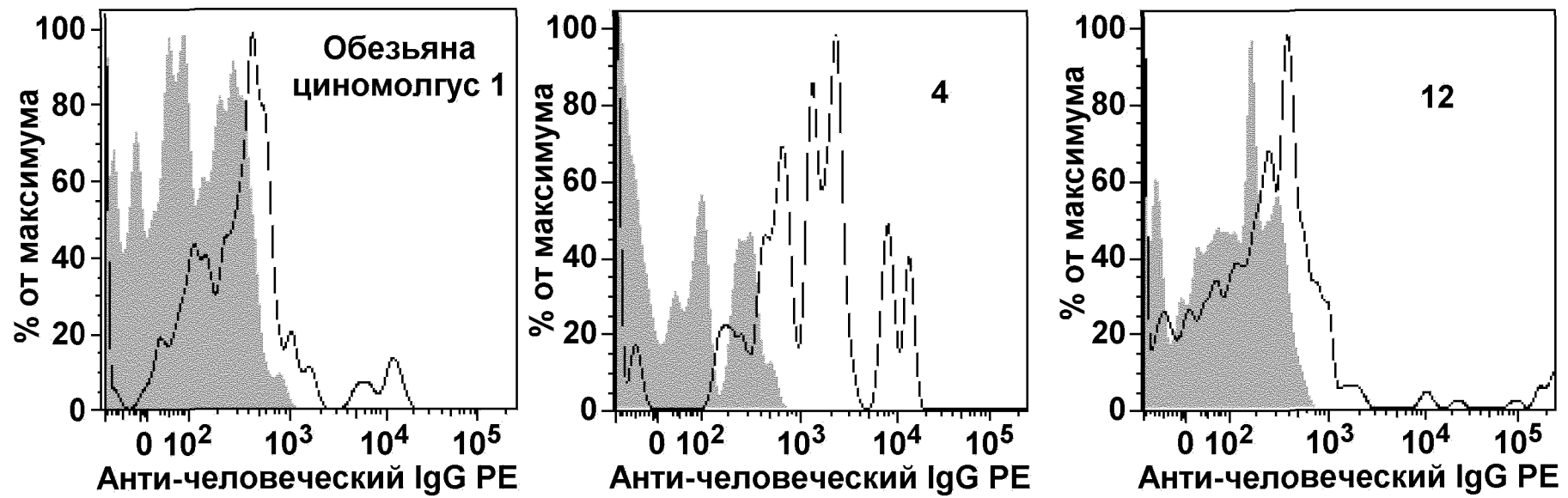
ФИГ.24

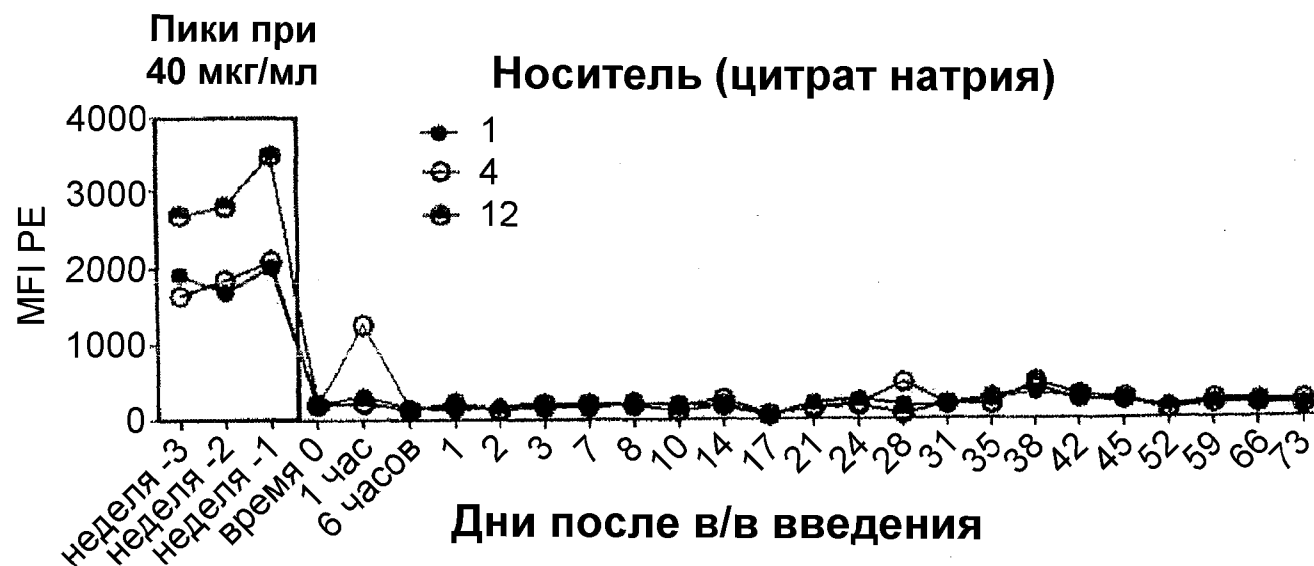


ФИГ.25



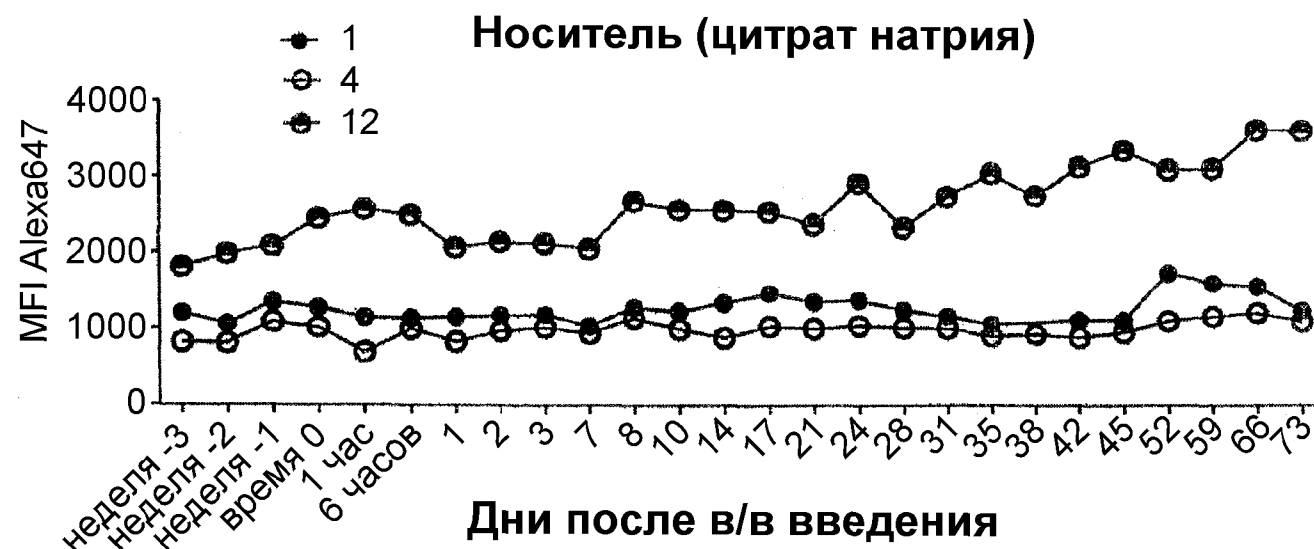
ФИГ.26А





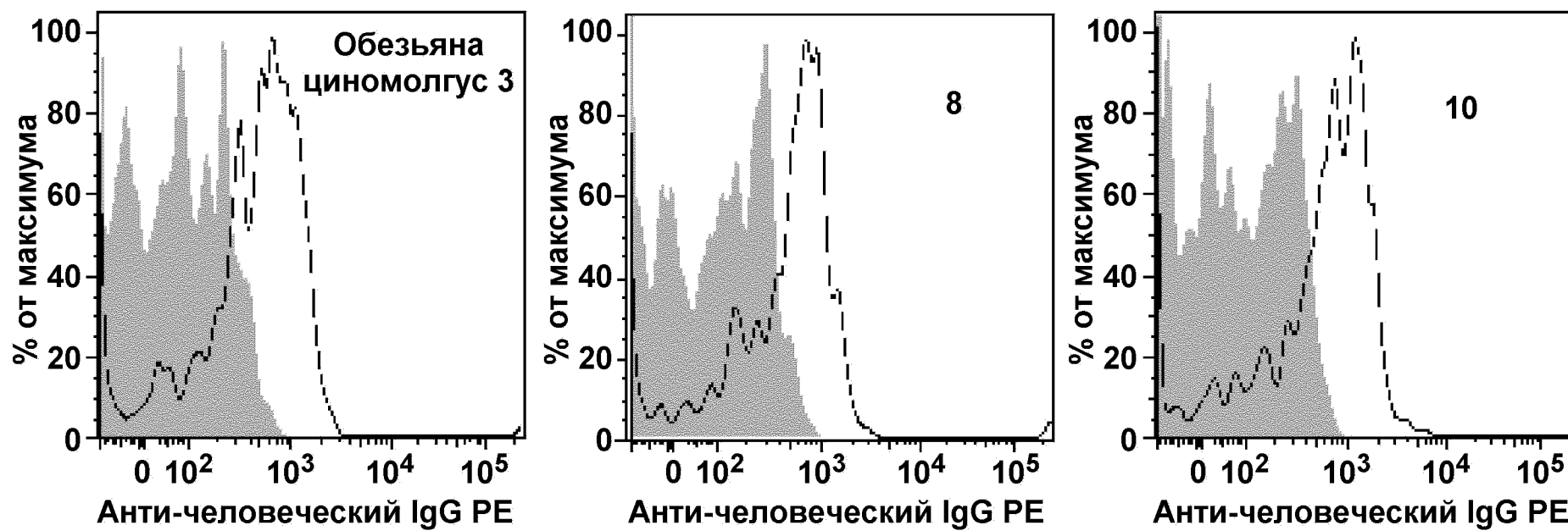
ФИГ.26В

26/63



ФИГ.26С

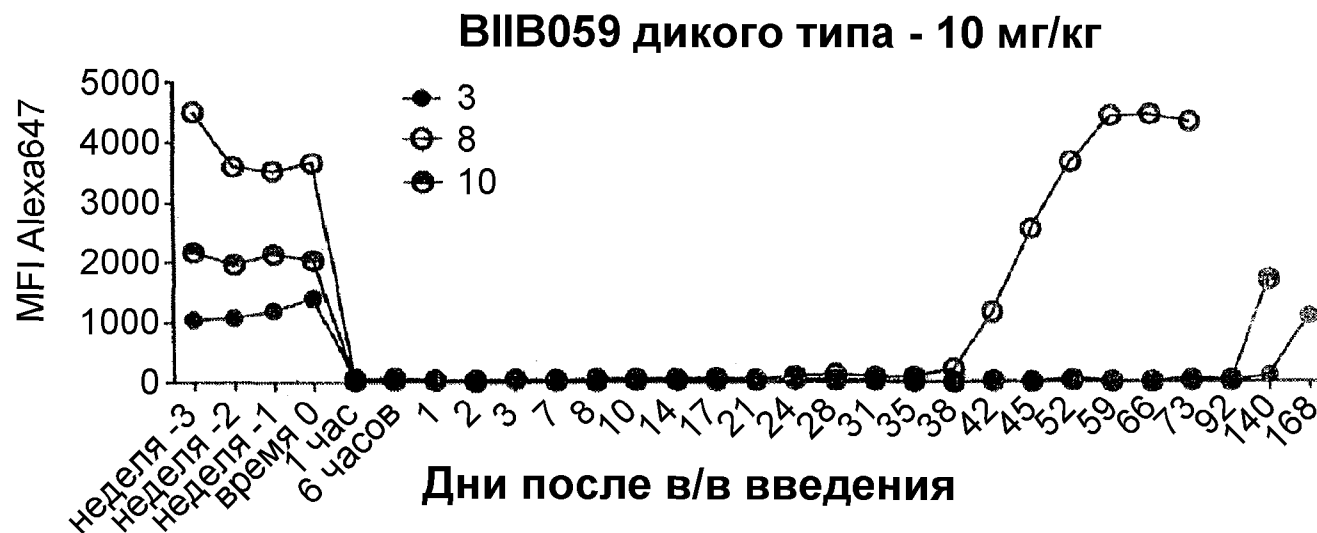
ФИГ.27А





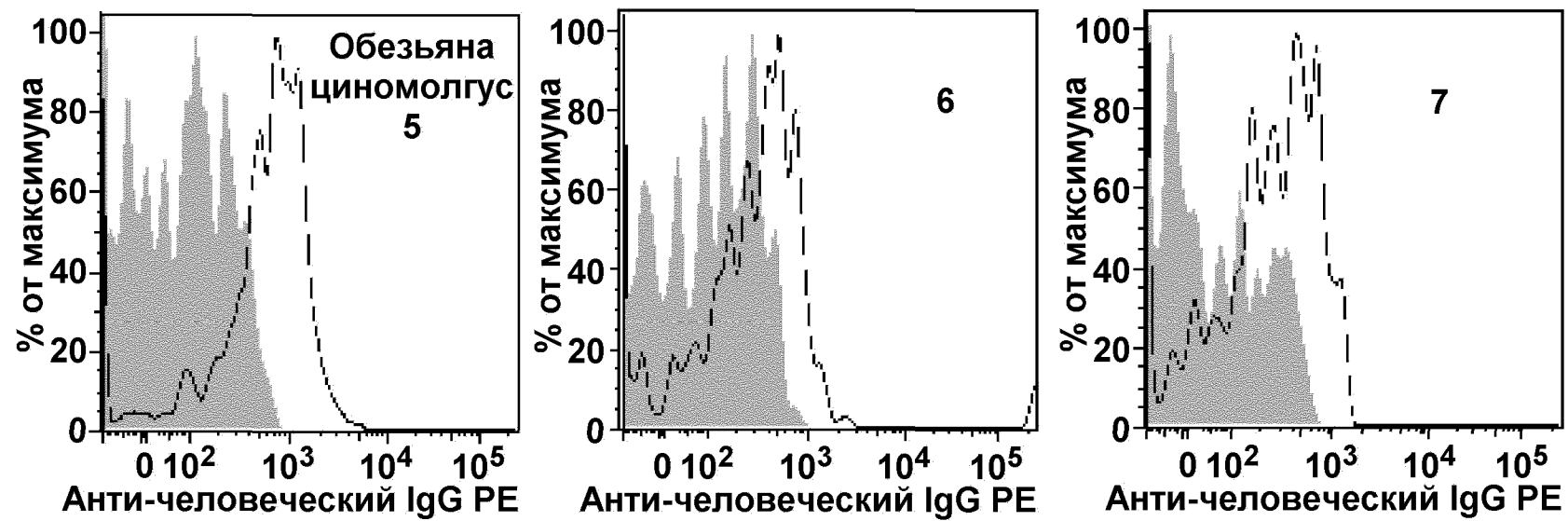
ФИГ.27В

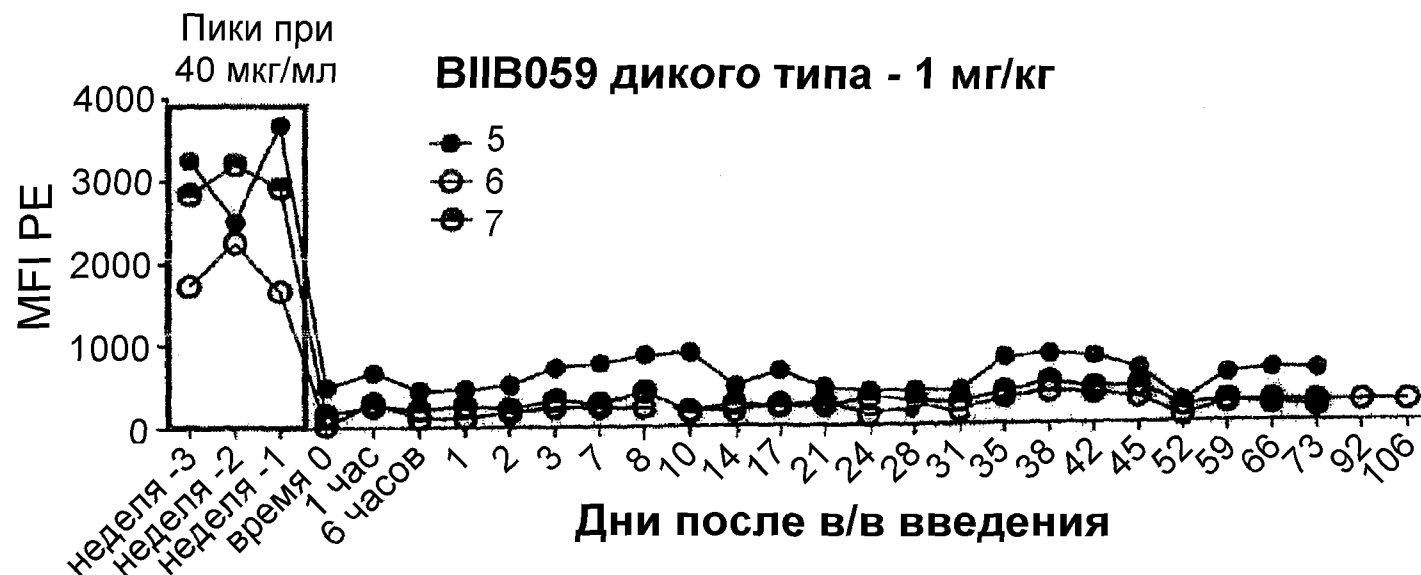
28/63



ФИГ.27С

ФИГ.28А



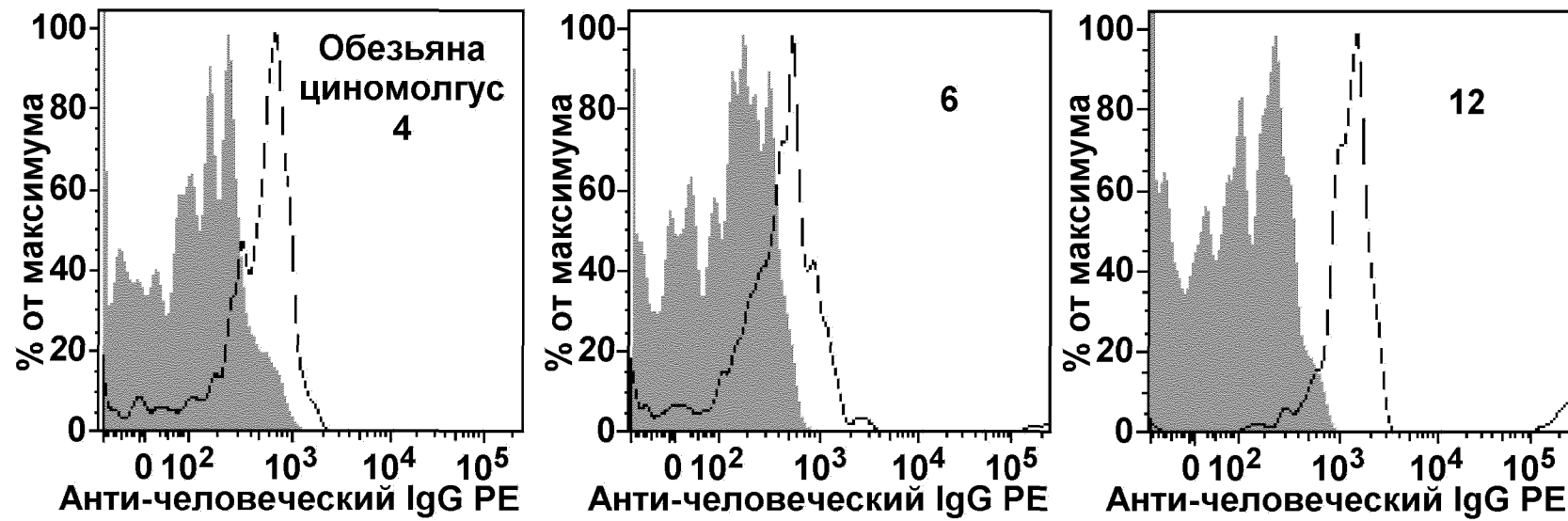


ФИГ.28В



ФИГ.28С

ФИГ.29А



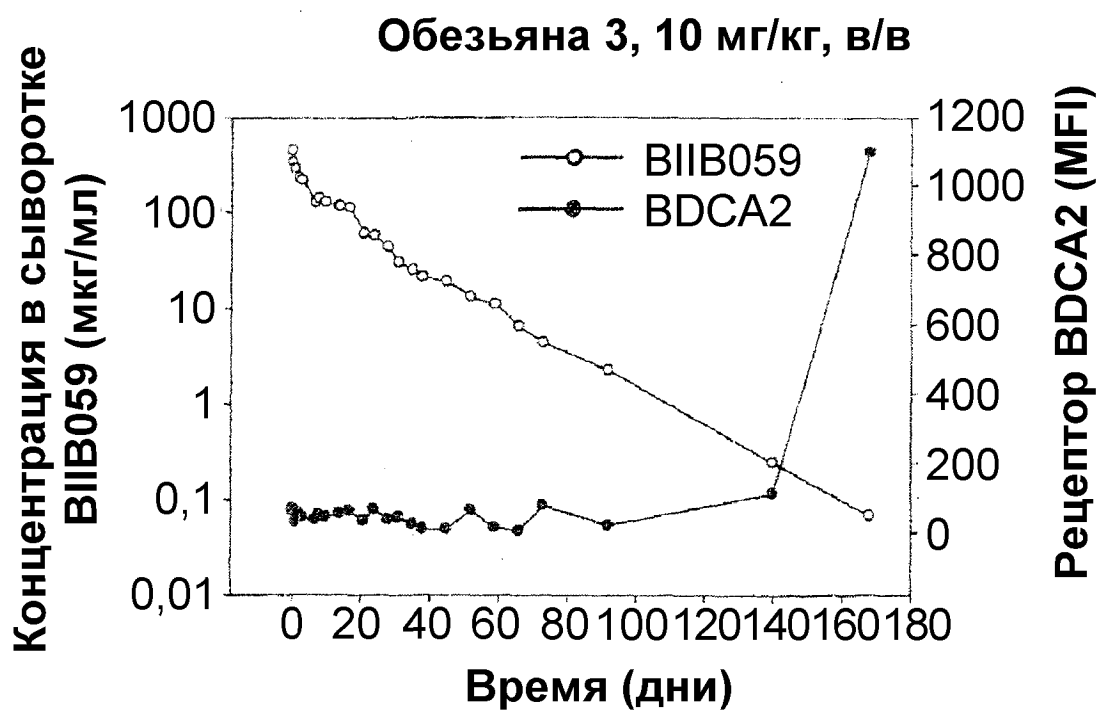
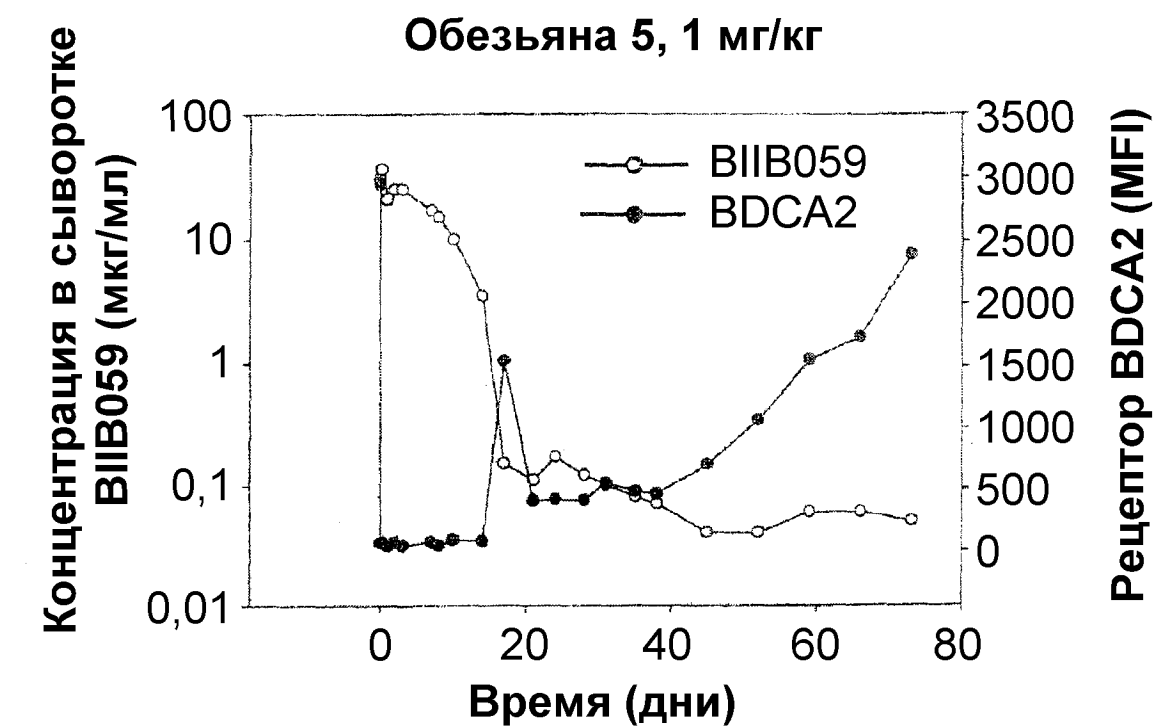


ФИГ.29В

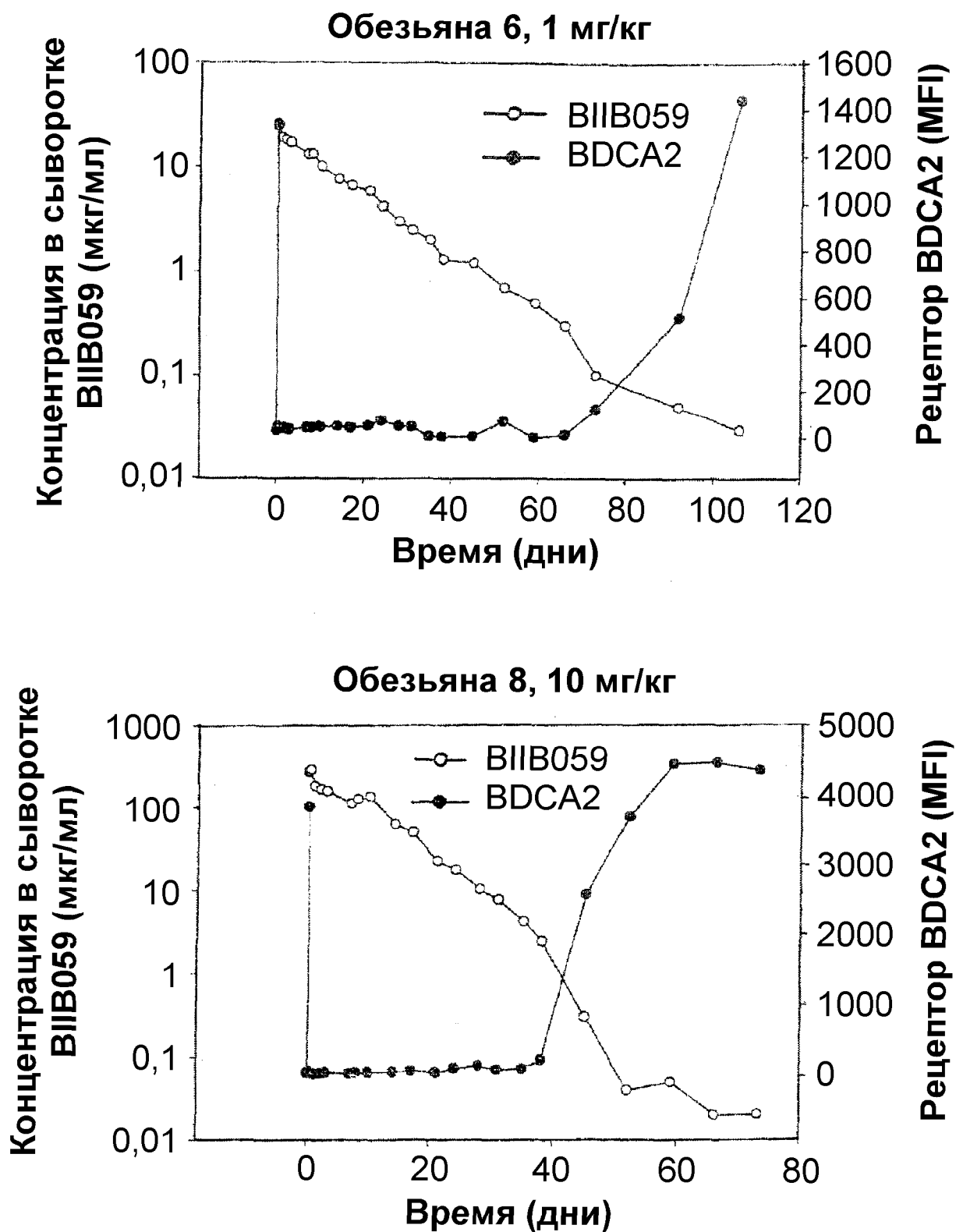


ФИГ.29С

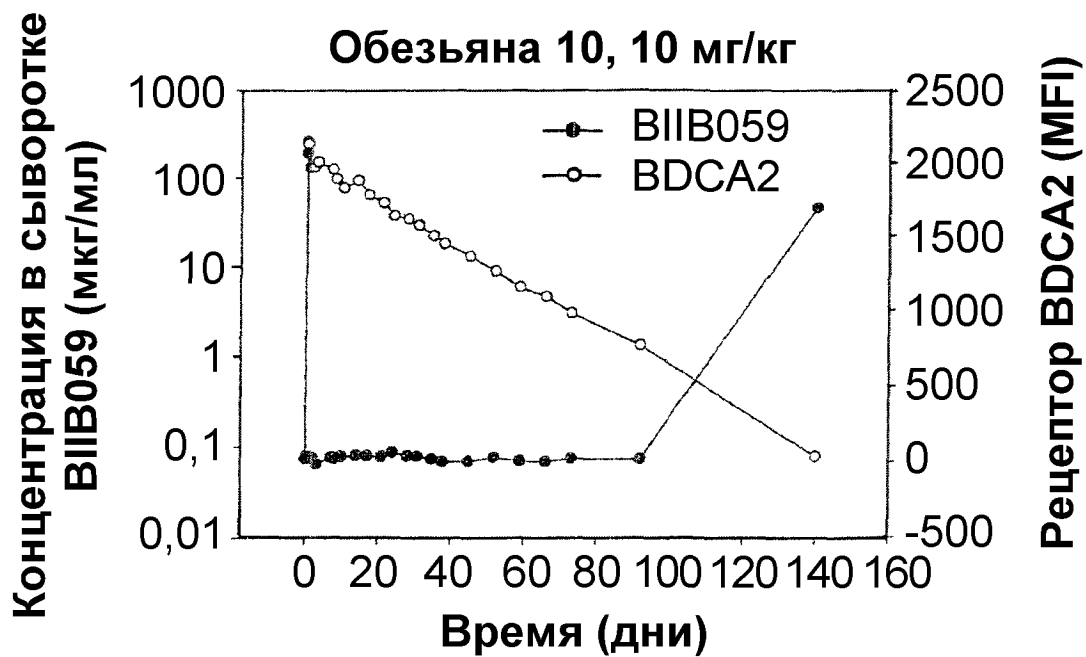
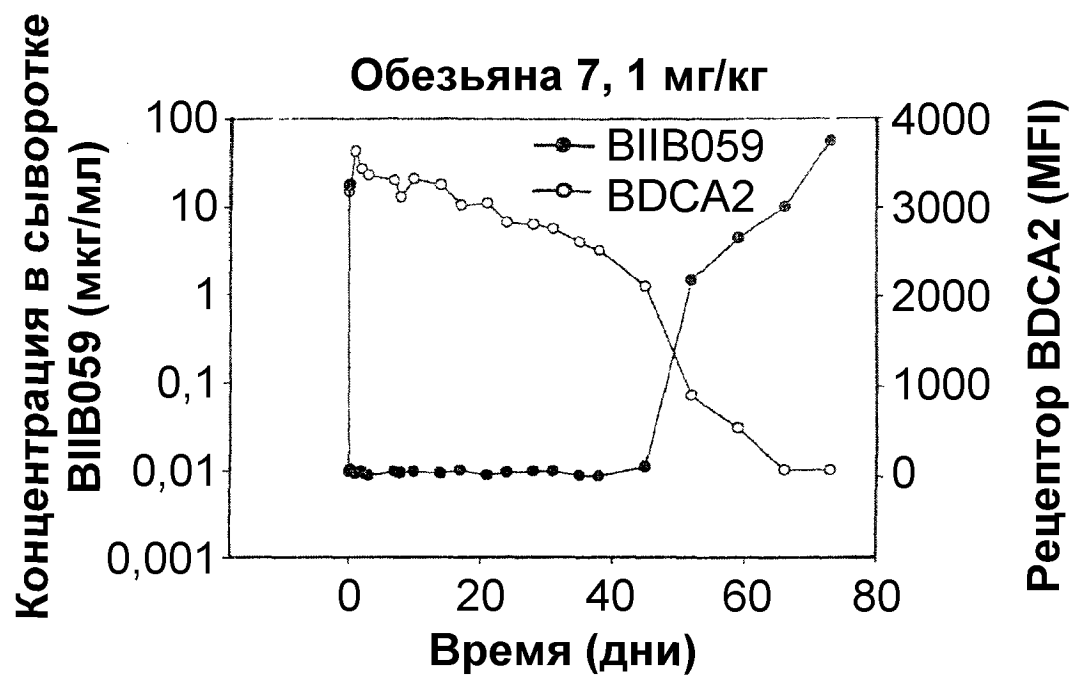
ФИГ.30-1



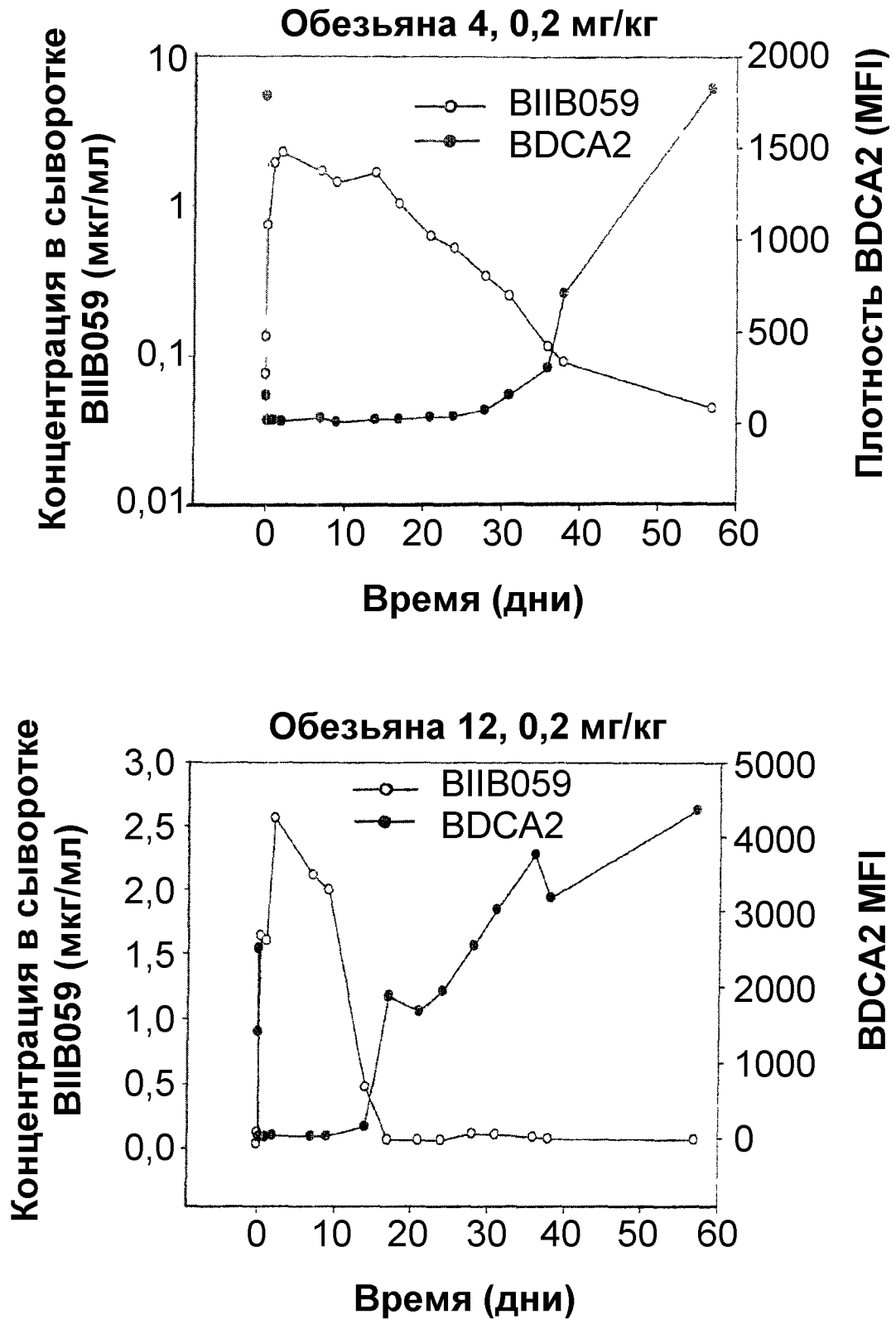
ФИГ.30-2



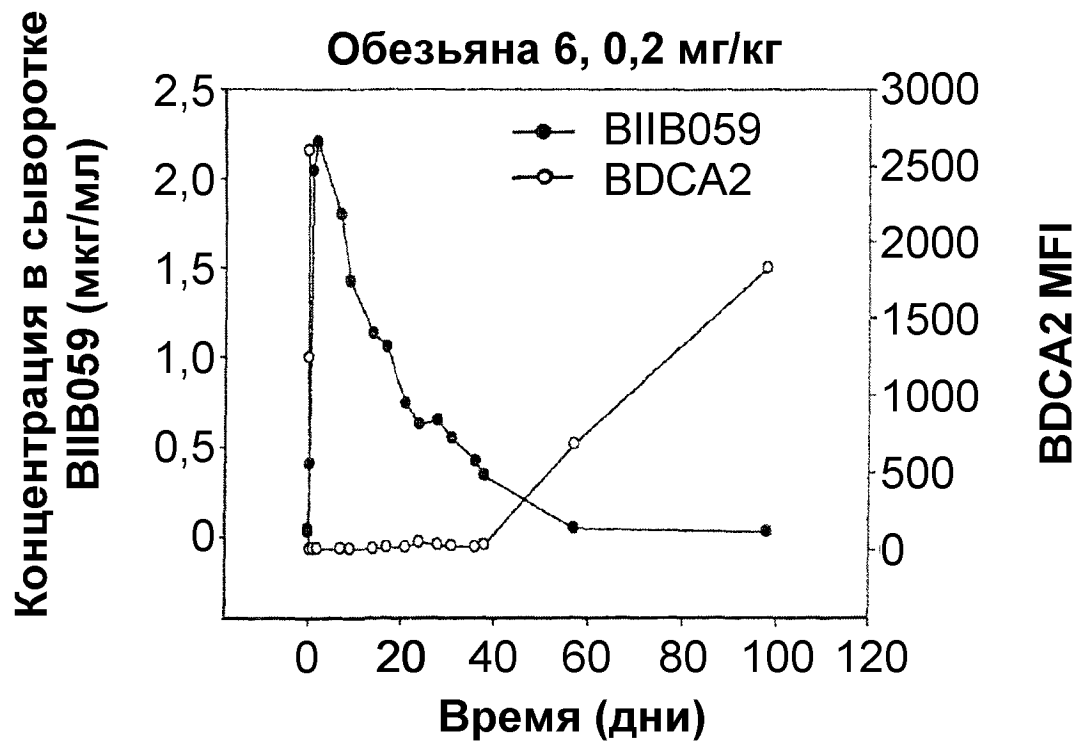
ФИГ.30-3

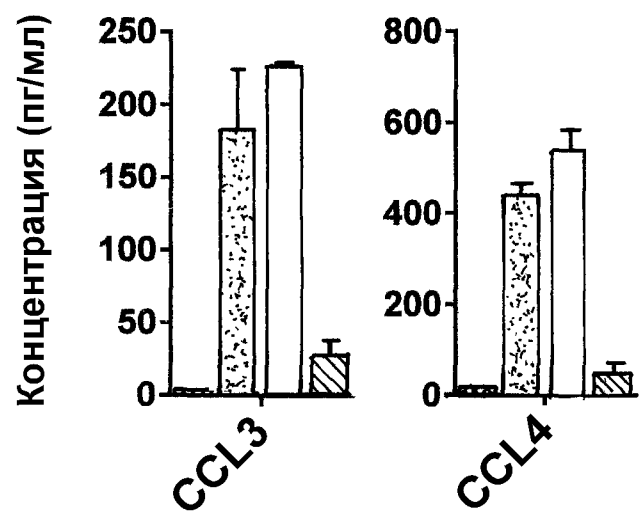
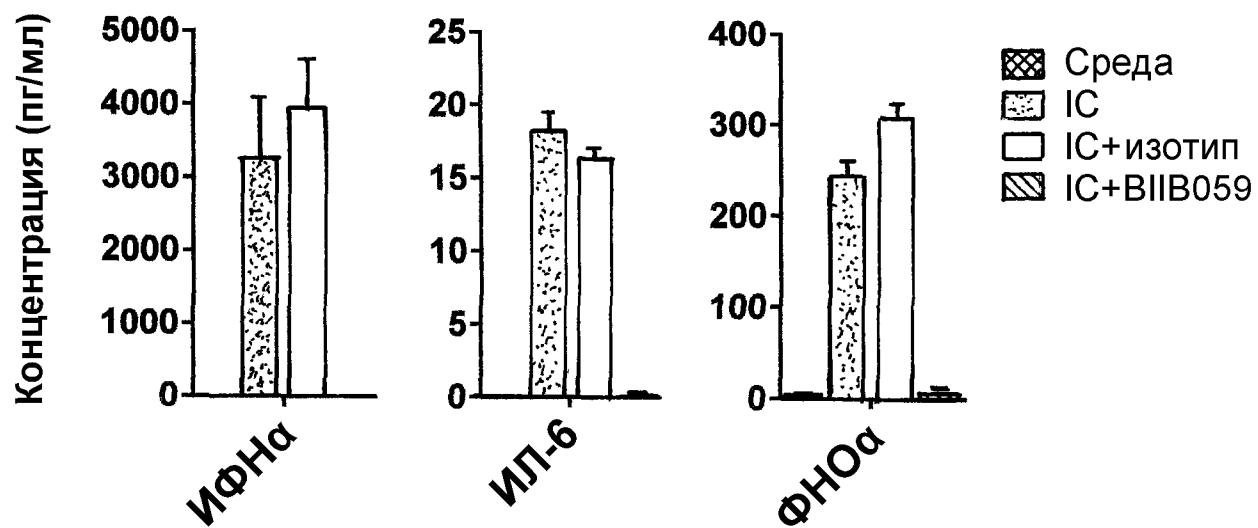


ФИГ.31-1

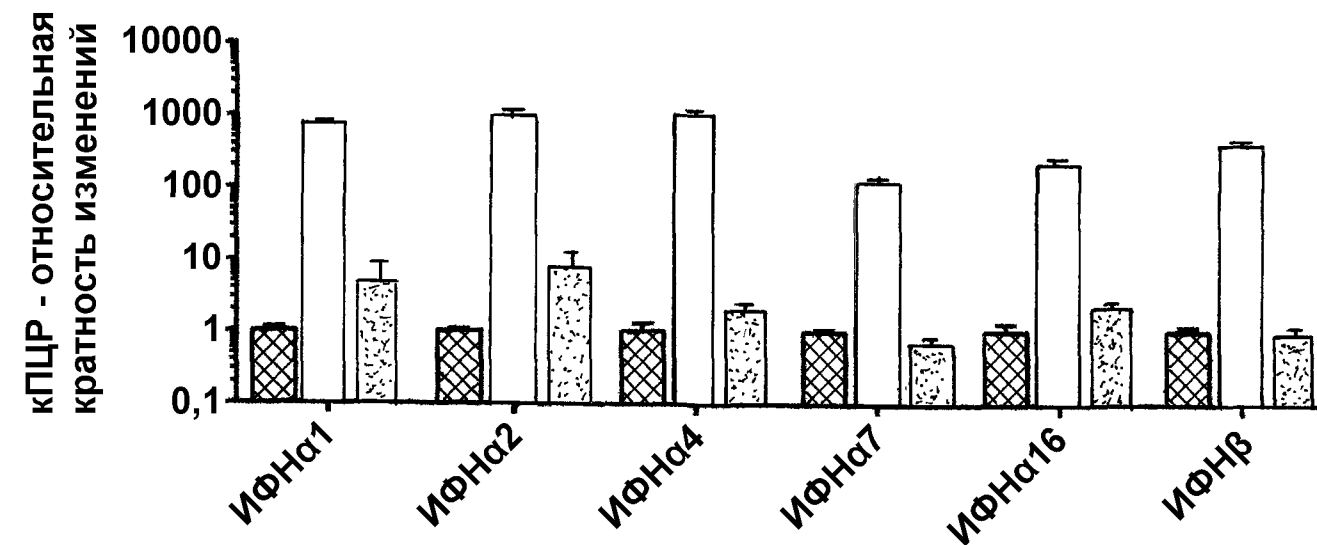


ФИГ.31-2



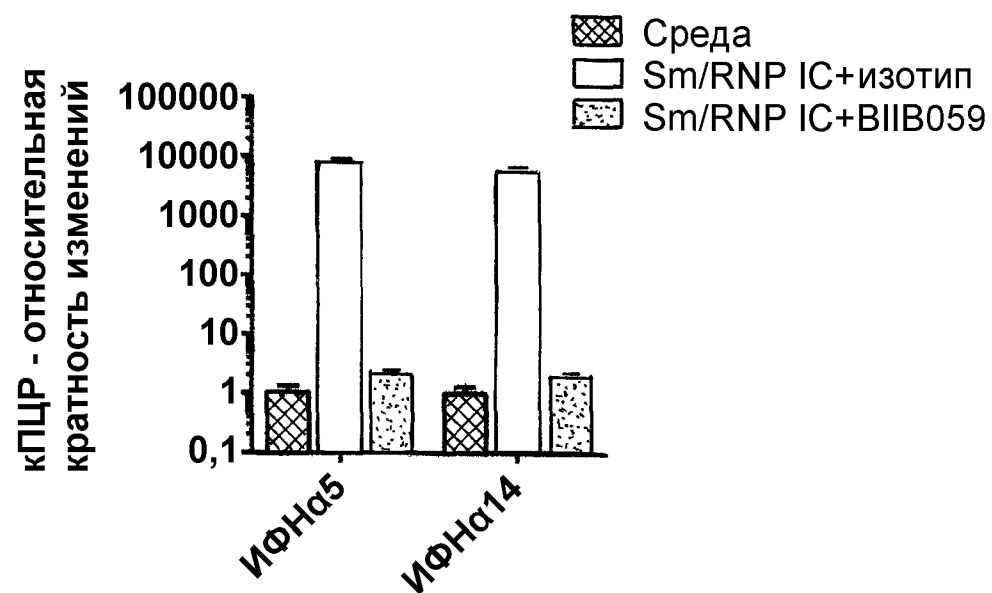


ФИГ.33

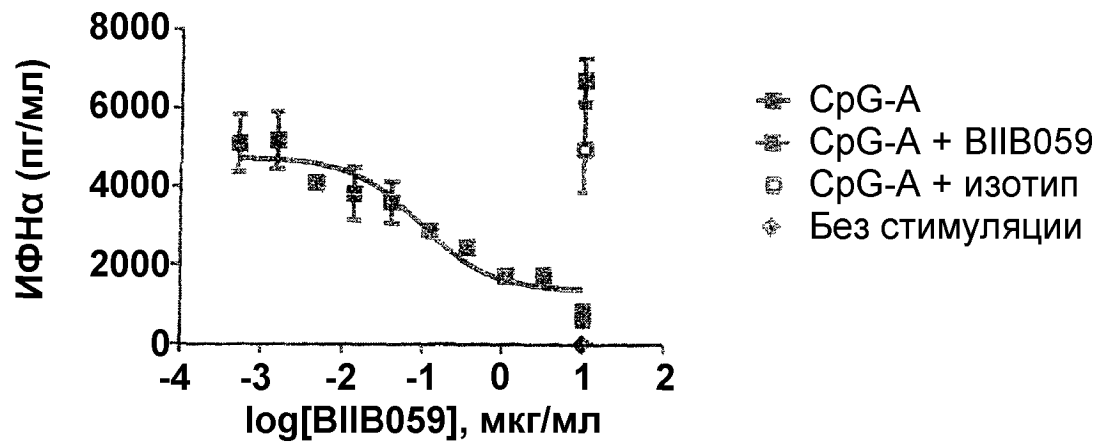


ФИГ.34

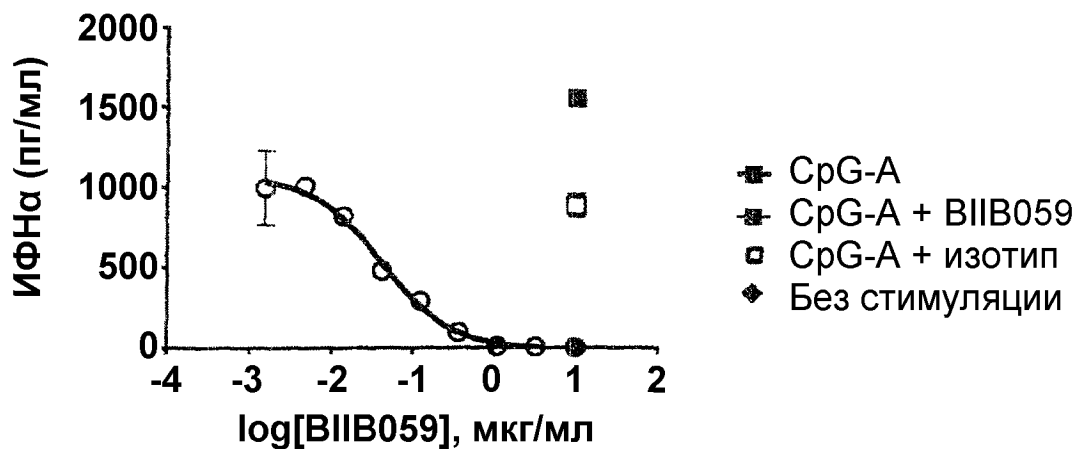
39/63



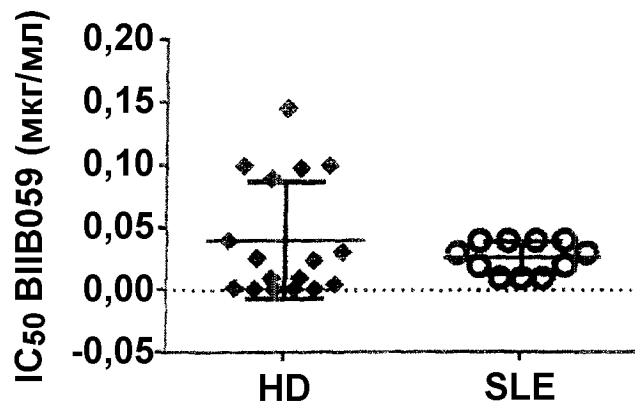
ФИГ.35А



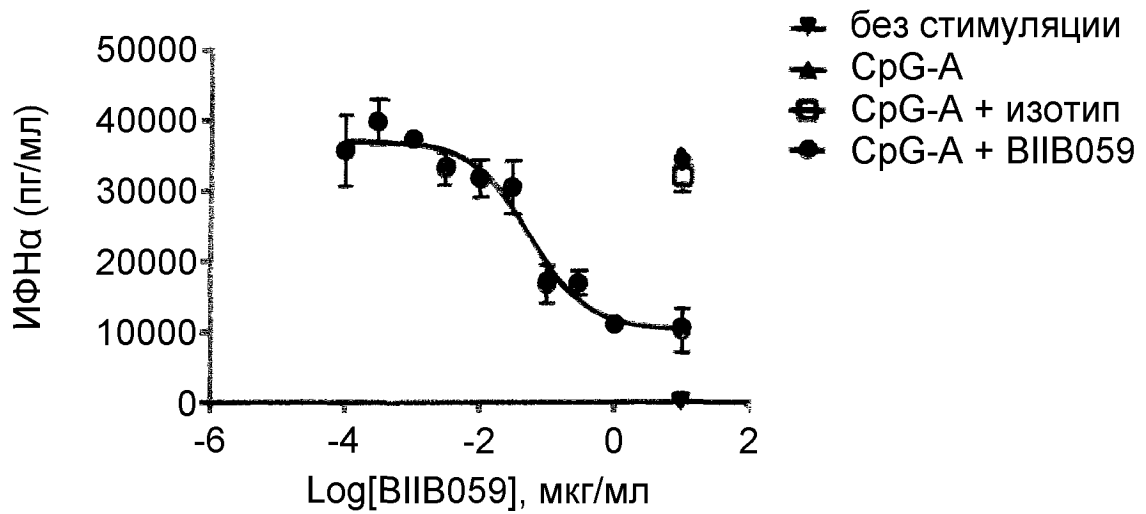
ФИГ.35В



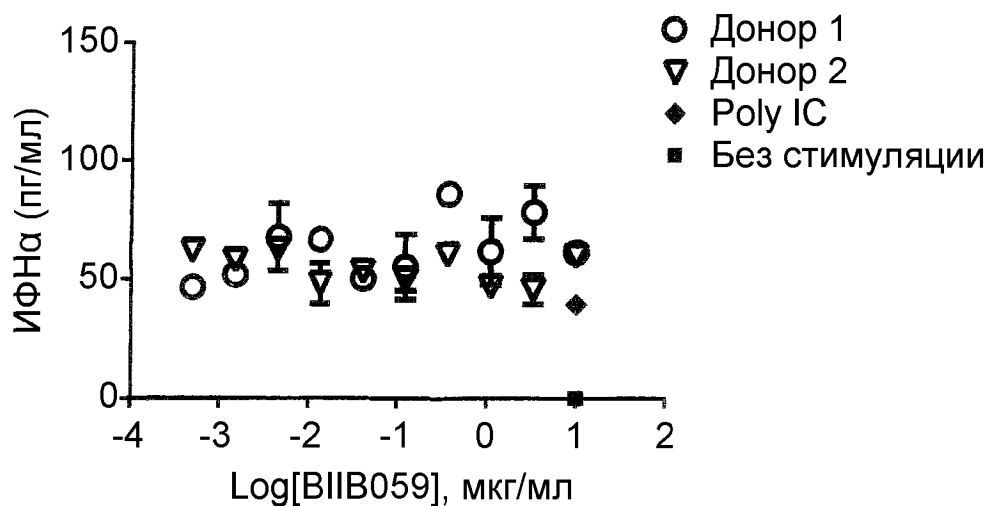
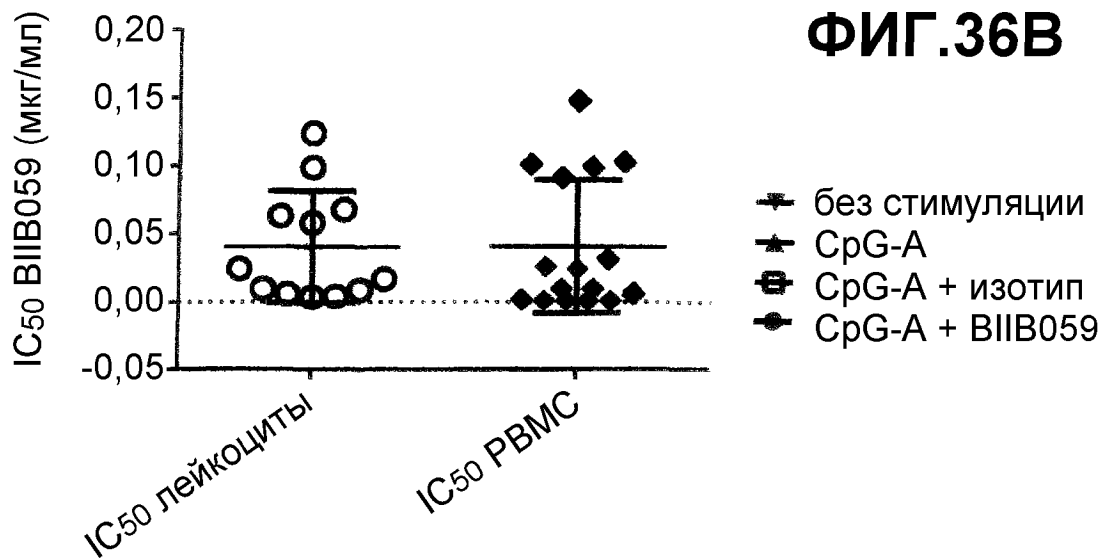
ФИГ.35С



ФИГ.36А

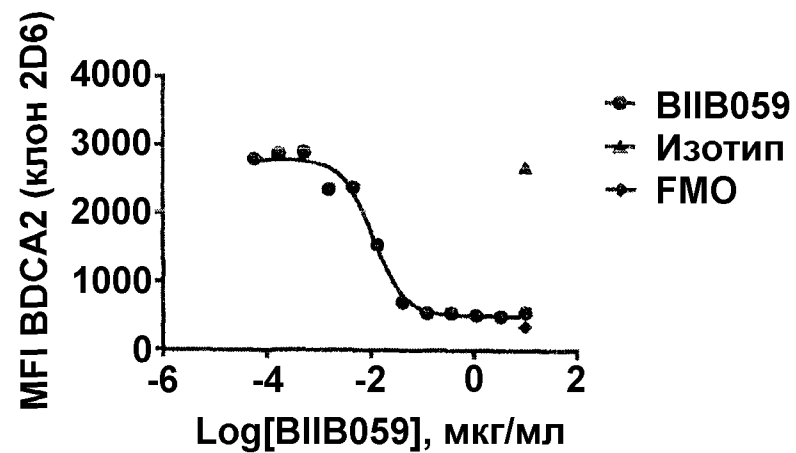


ФИГ.36В

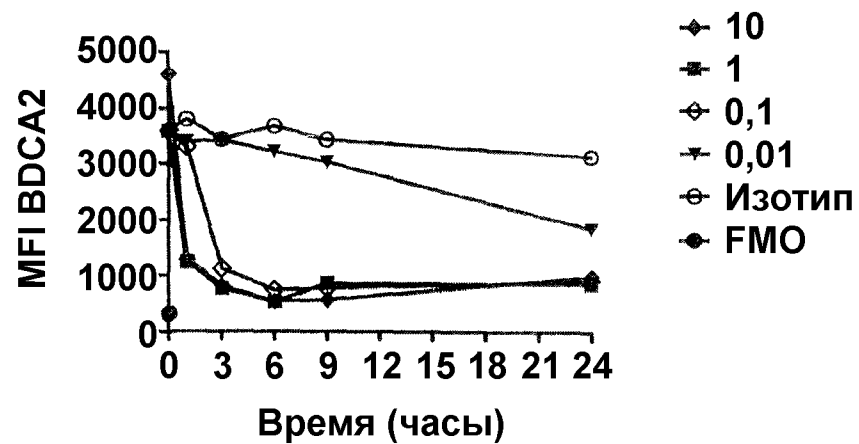
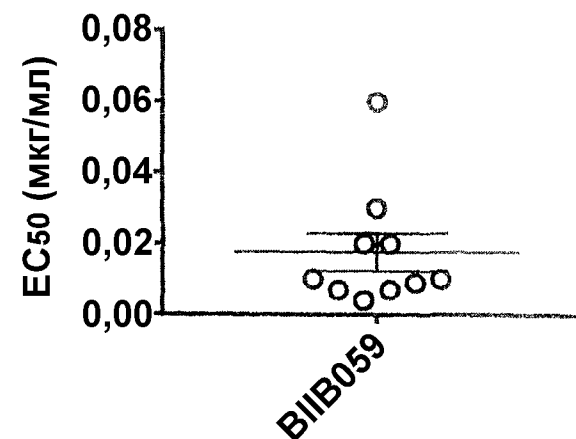


ФИГ.37

ФИГ.38А

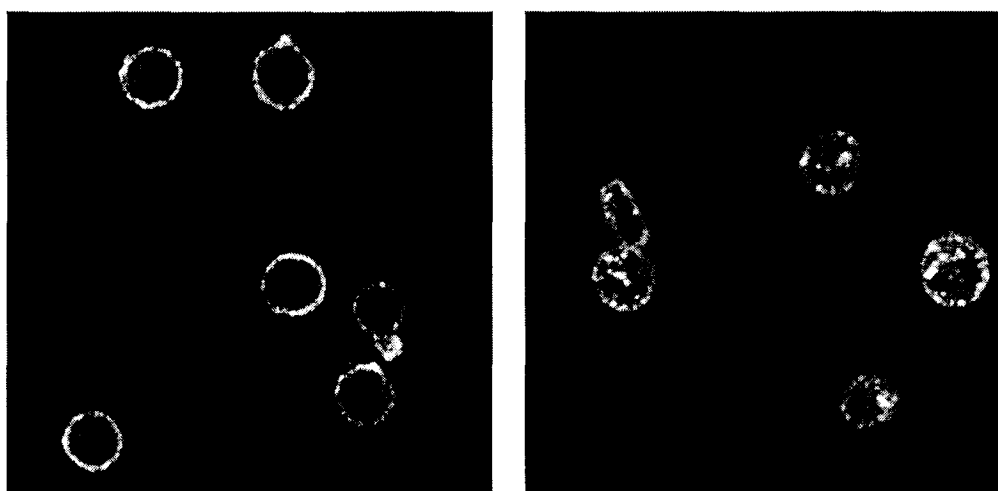


ФИГ.38В

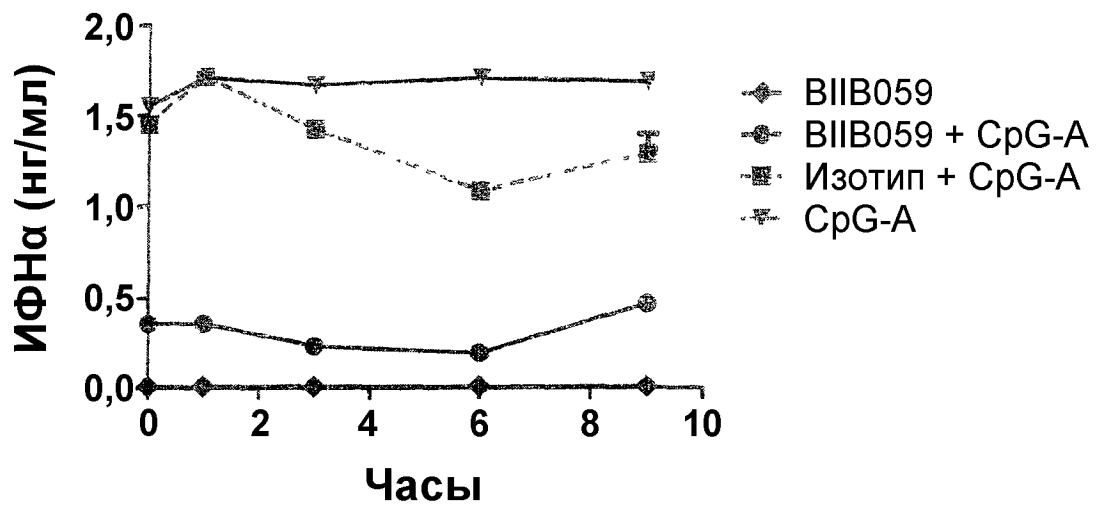


ФИГ.39

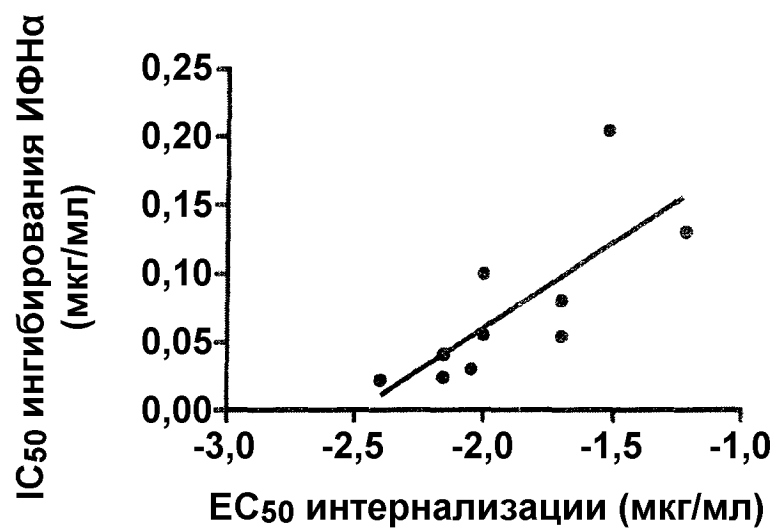
ФИГ.40

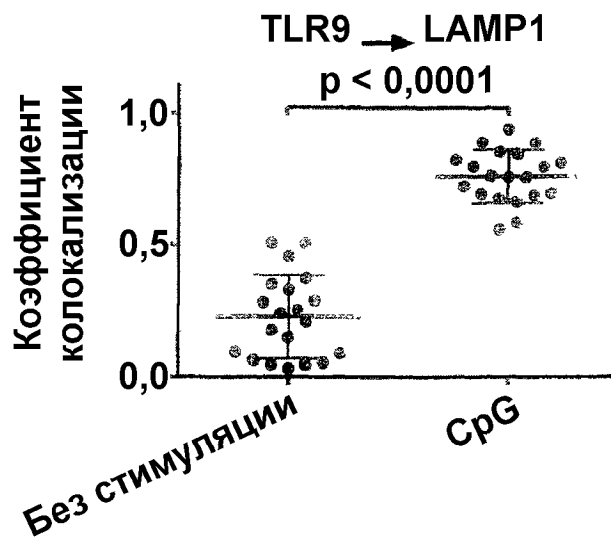


ФИГ.41

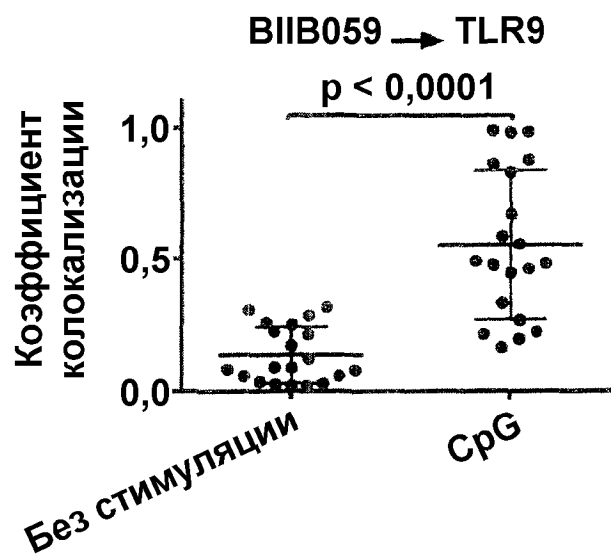


ФИГ.42

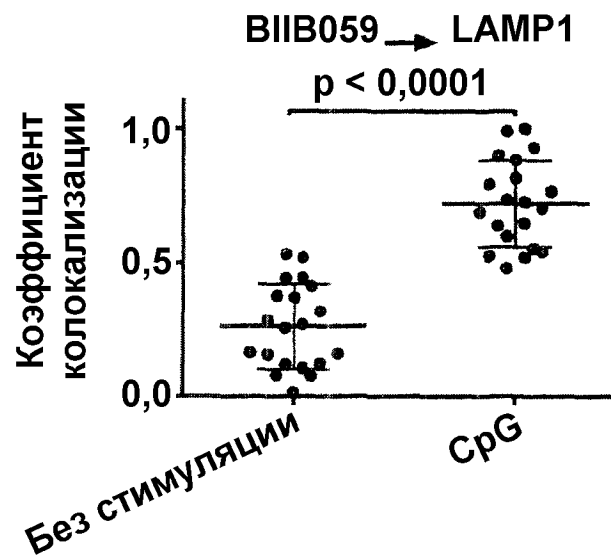




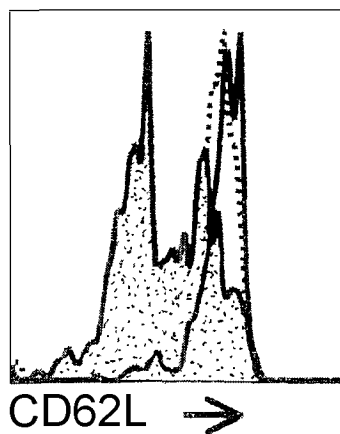
ФИГ.43А



ФИГ.43В

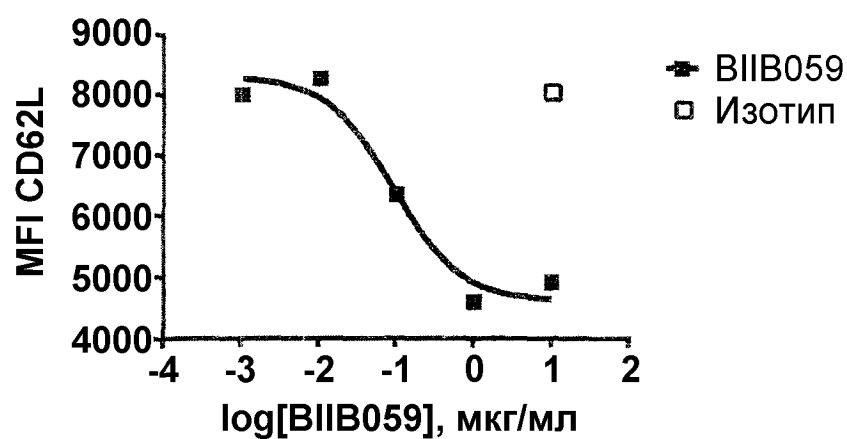


ФИГ.43С

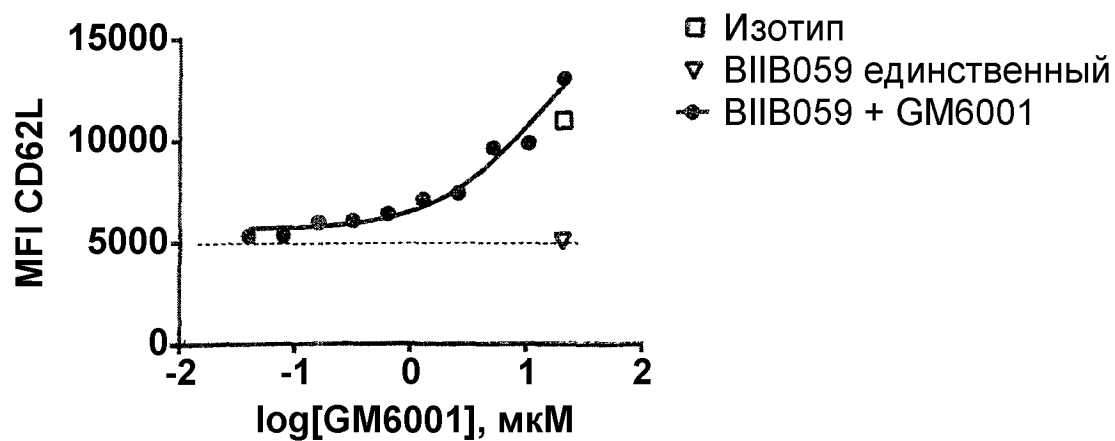


ФИГ.44А

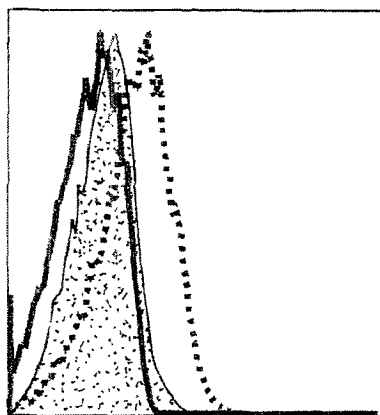
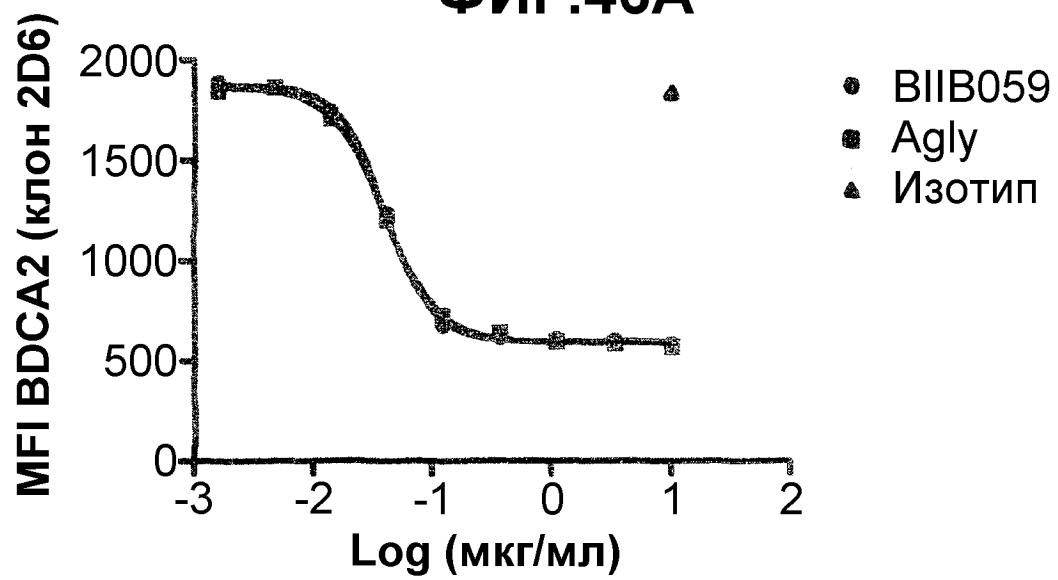
ФИГ.44В



ФИГ.45



ФИГ.46А

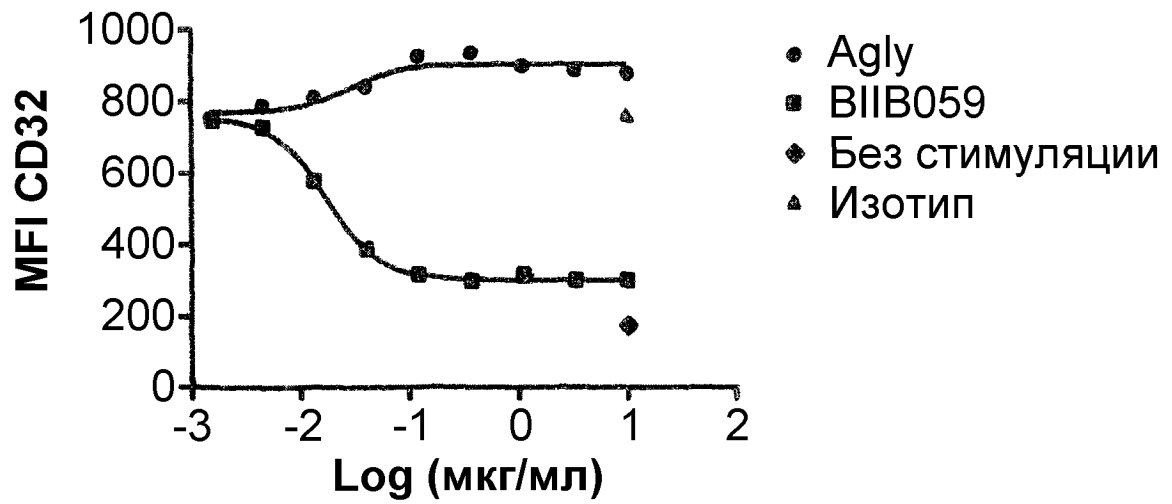


ФИГ.46В



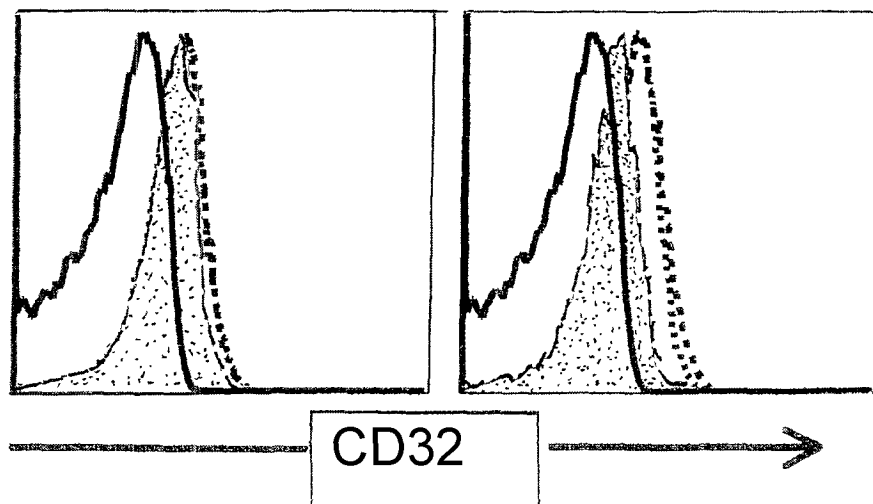
ФИГ.46С

ФИГ.46D

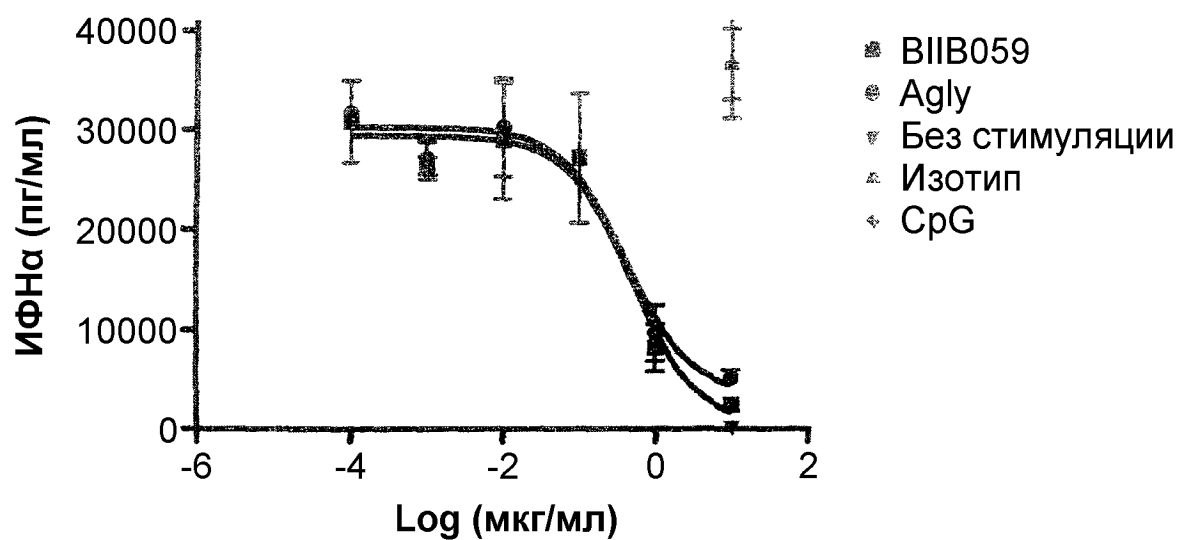


ФИГ.46E

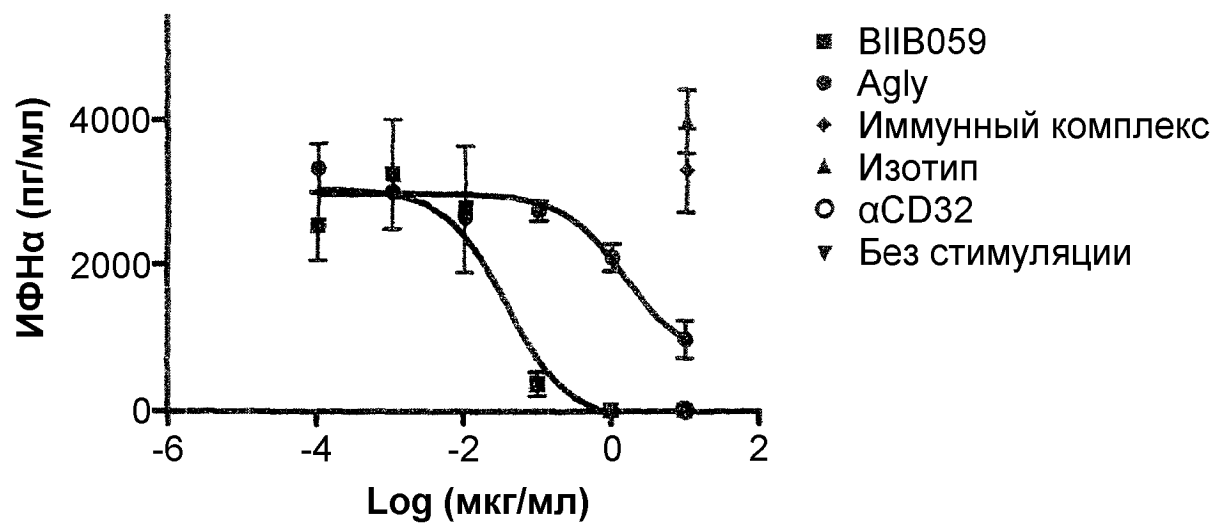
ФИГ.46F



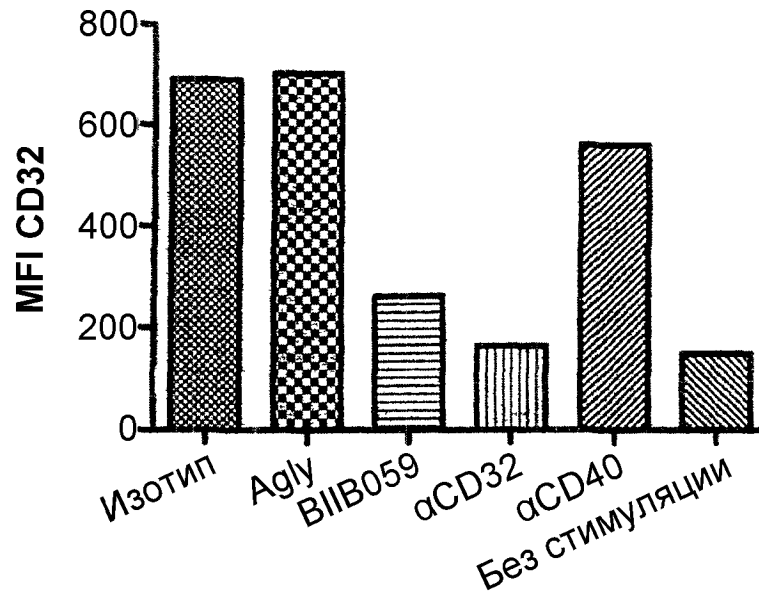
ФИГ.47А



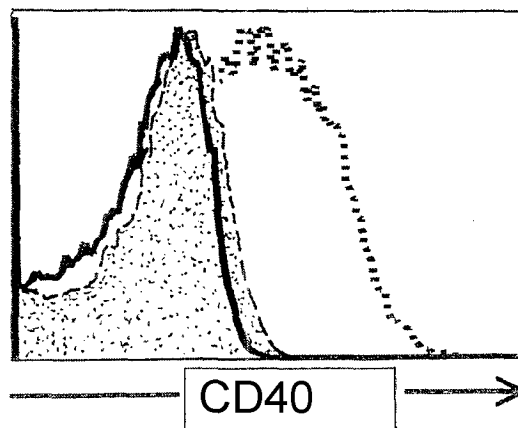
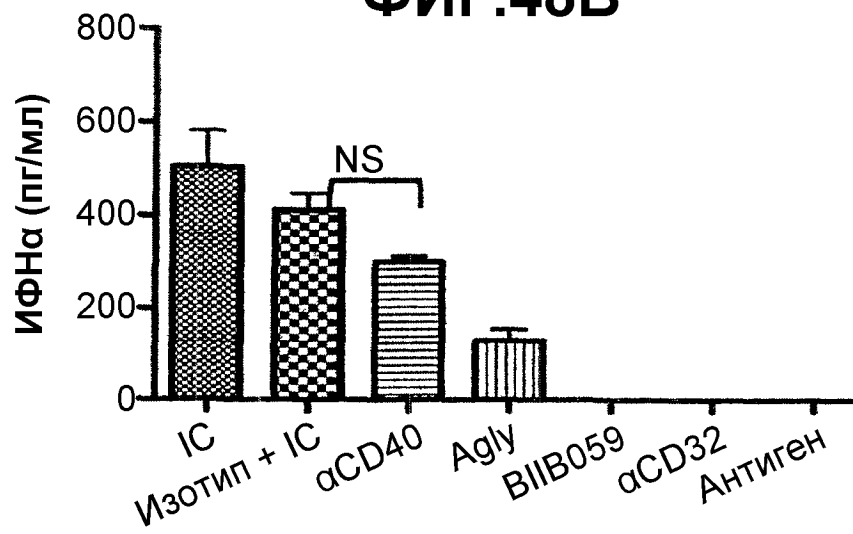
ФИГ.47В



ФИГ.48А

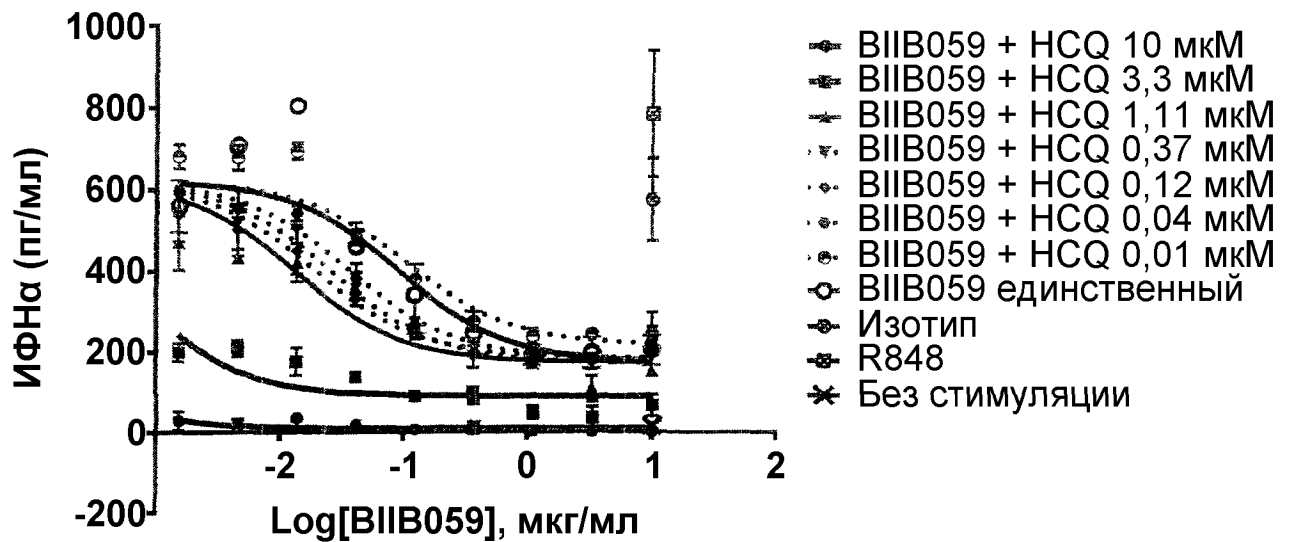


ФИГ.48В

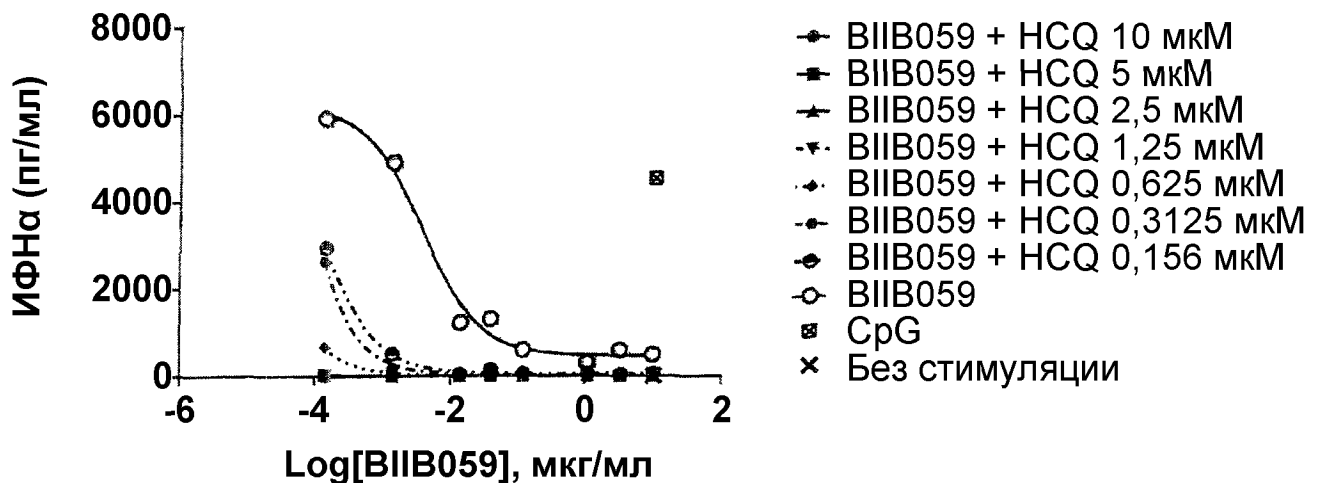


ФИГ.48С

ФИГ.49

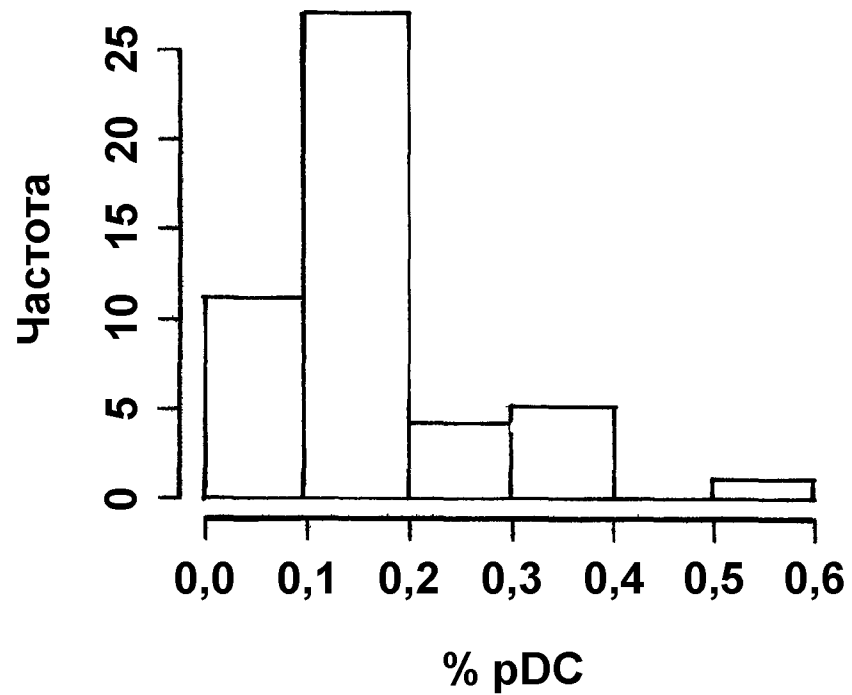


ФИГ.50

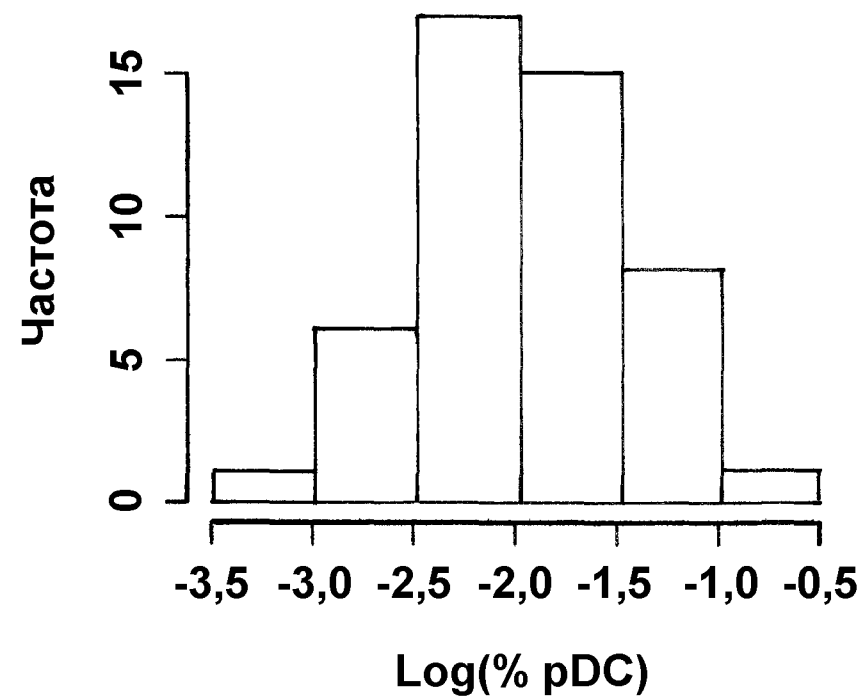


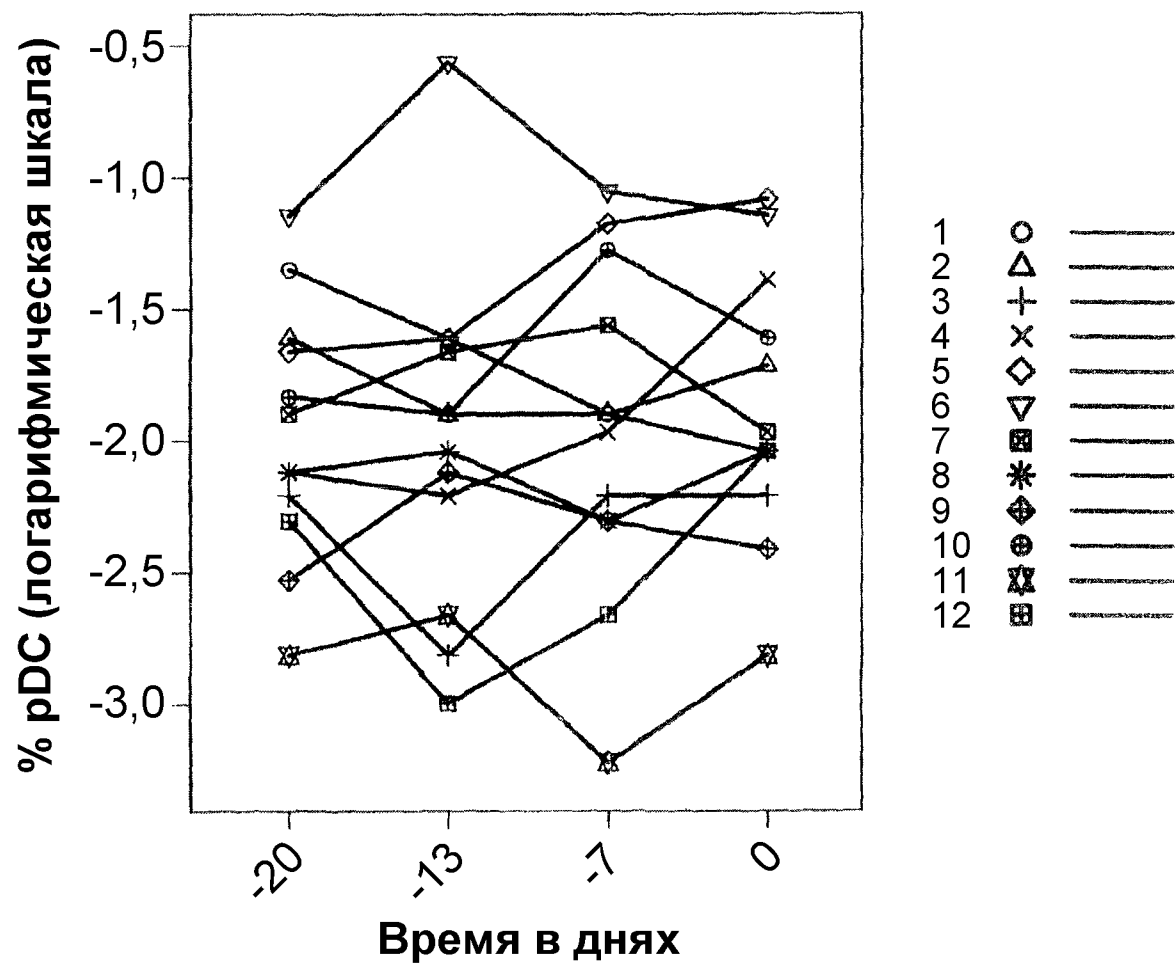
ФИГ.51

**Процентное распределение pDC
(исходный уровень)**

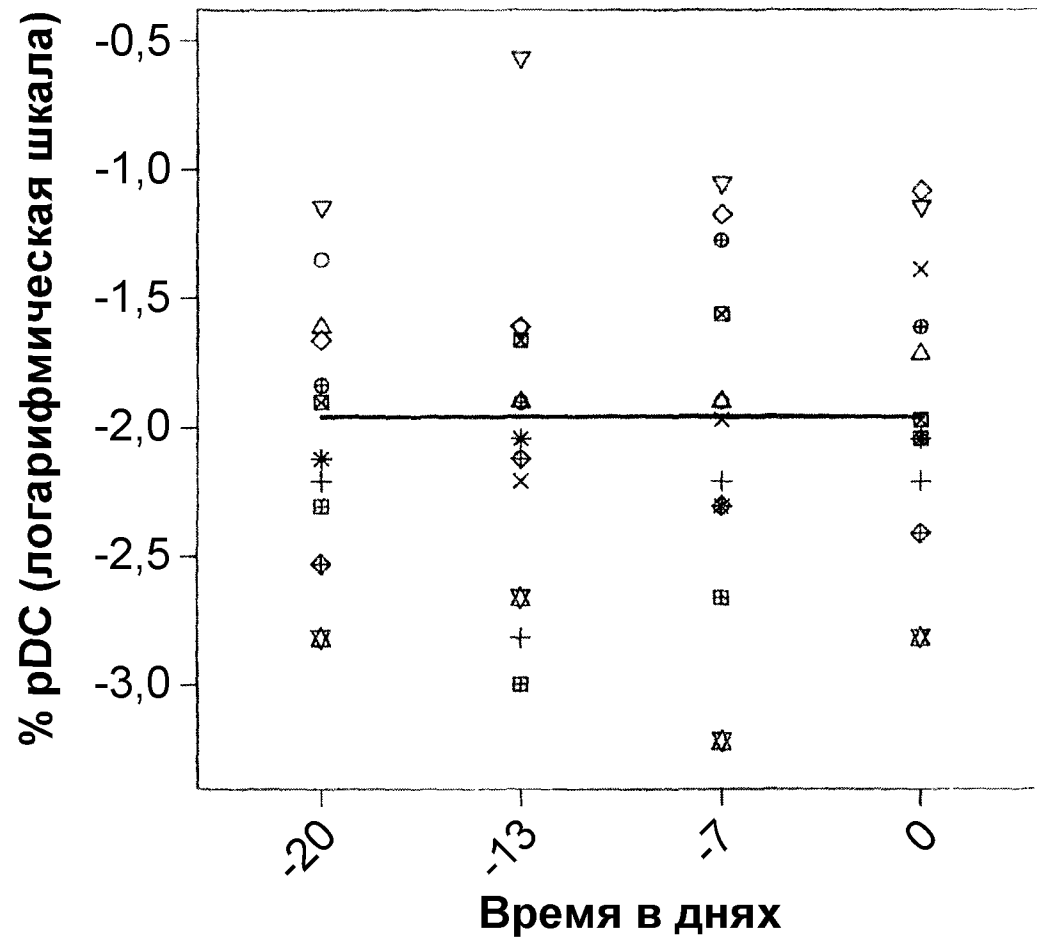


**Процентное распределение pDC
(исходный уровень)
по логарифмической шкале**



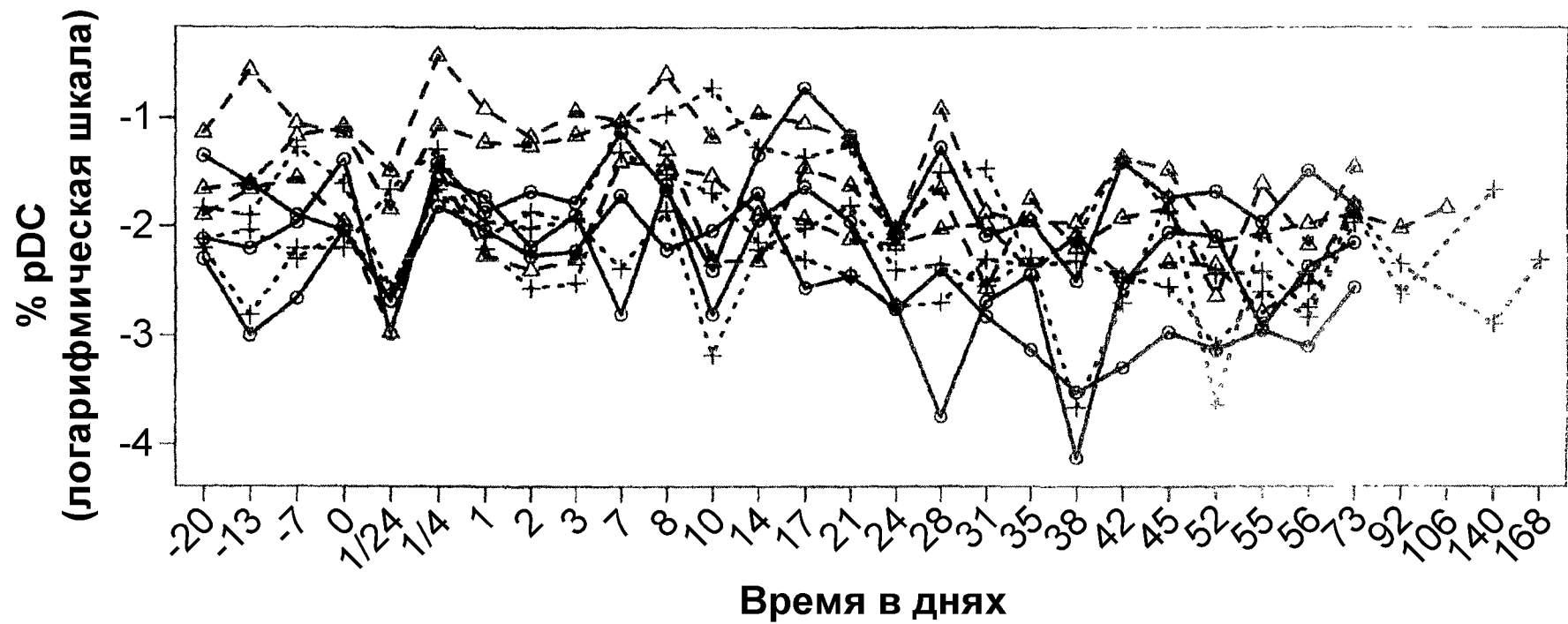


ФИГ.52

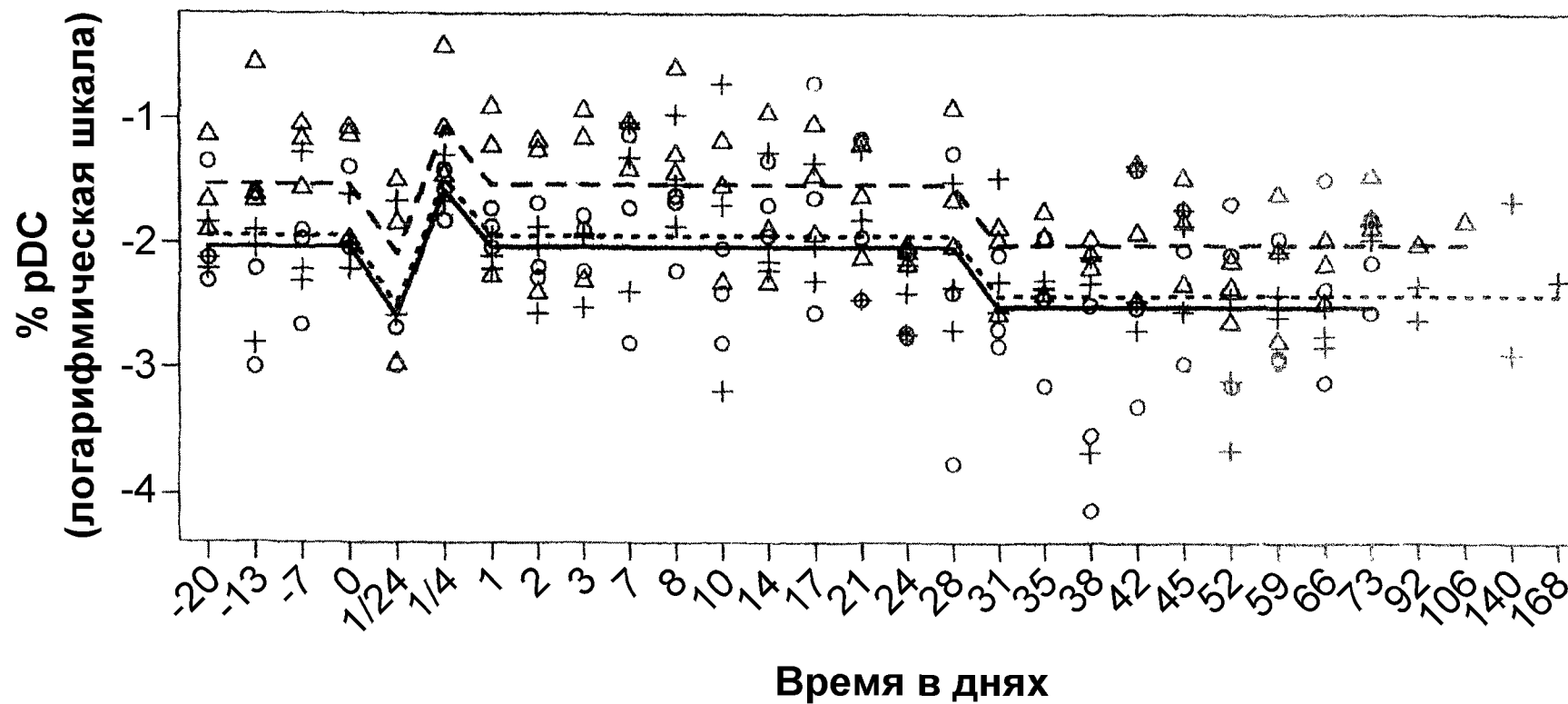


ФИГ.53

ФИГ.54

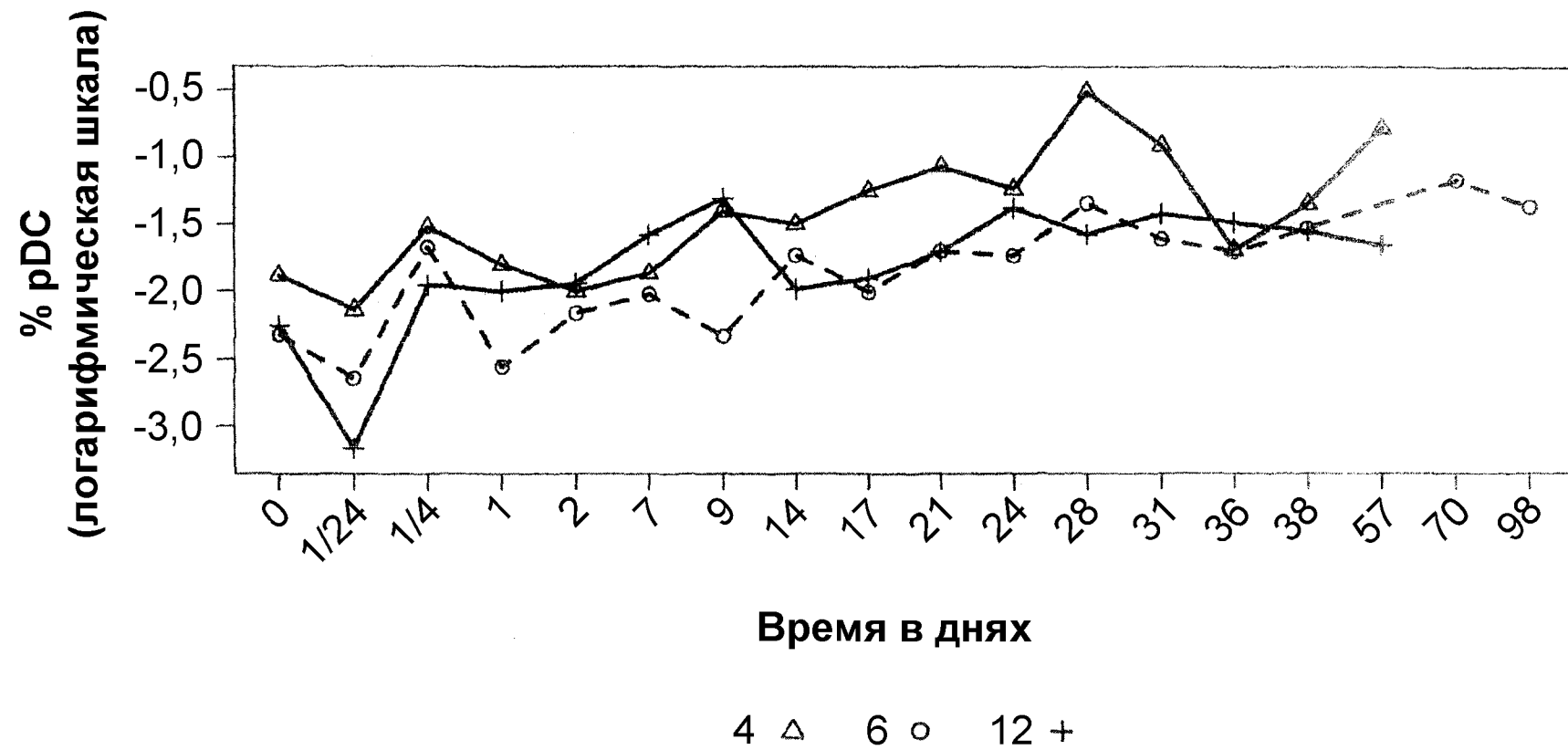


ФИГ.55

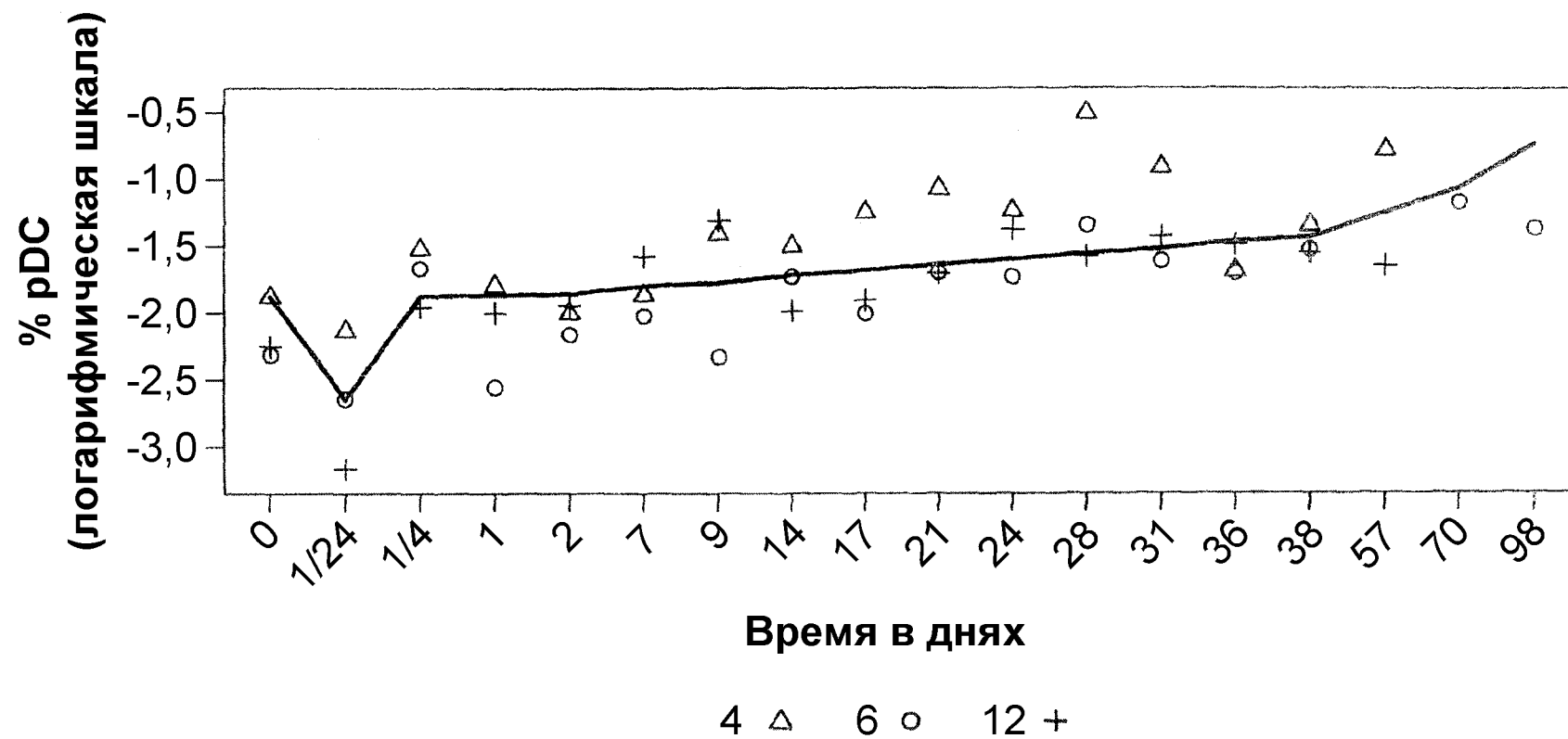


Носитель —○ ВІВ059, 1 мг/кг ---△ ВІВ059, 10 мг/кг+

ФИГ.56



ФИГ.57



Исследование внутривенного введения

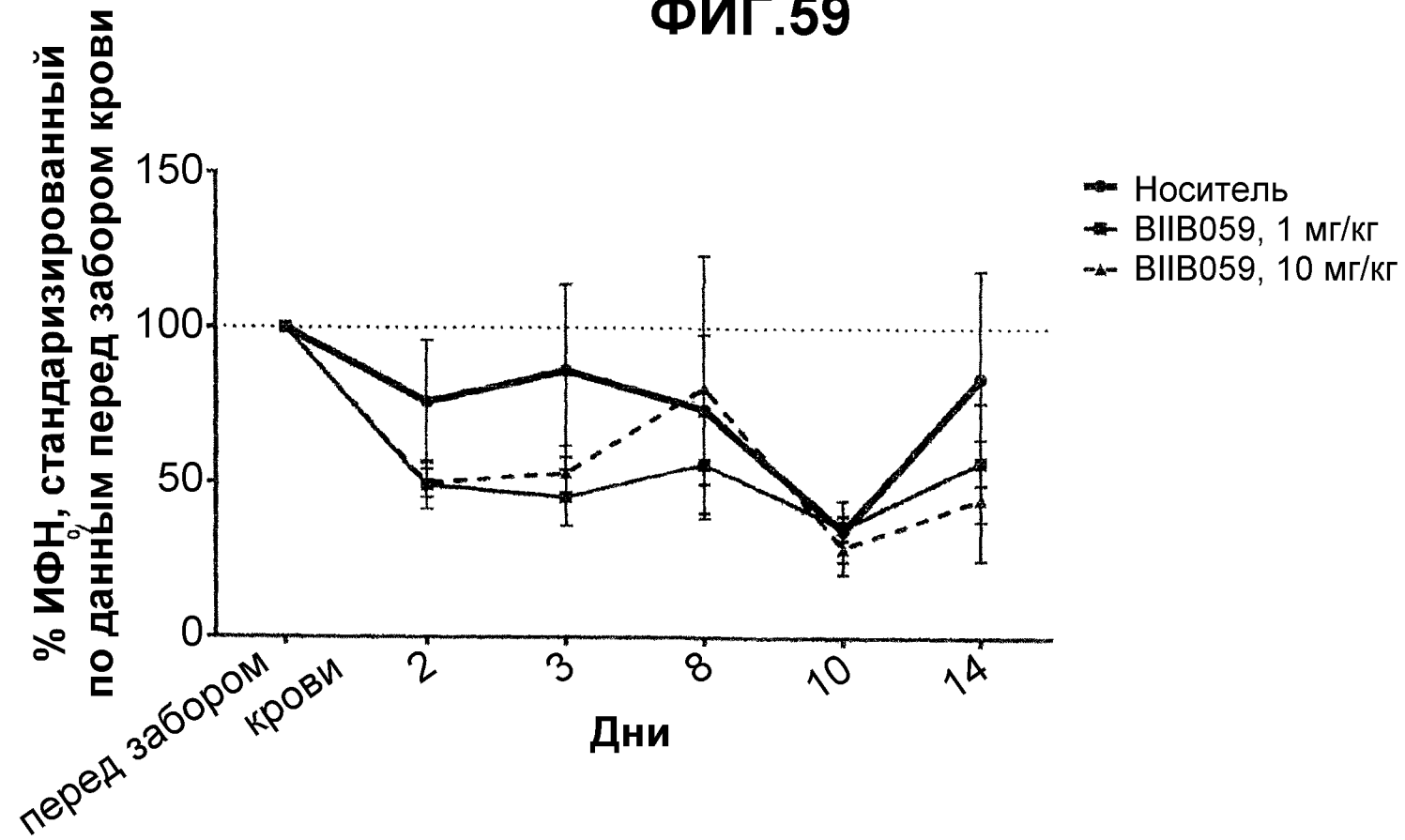


Исследование подкожного введения

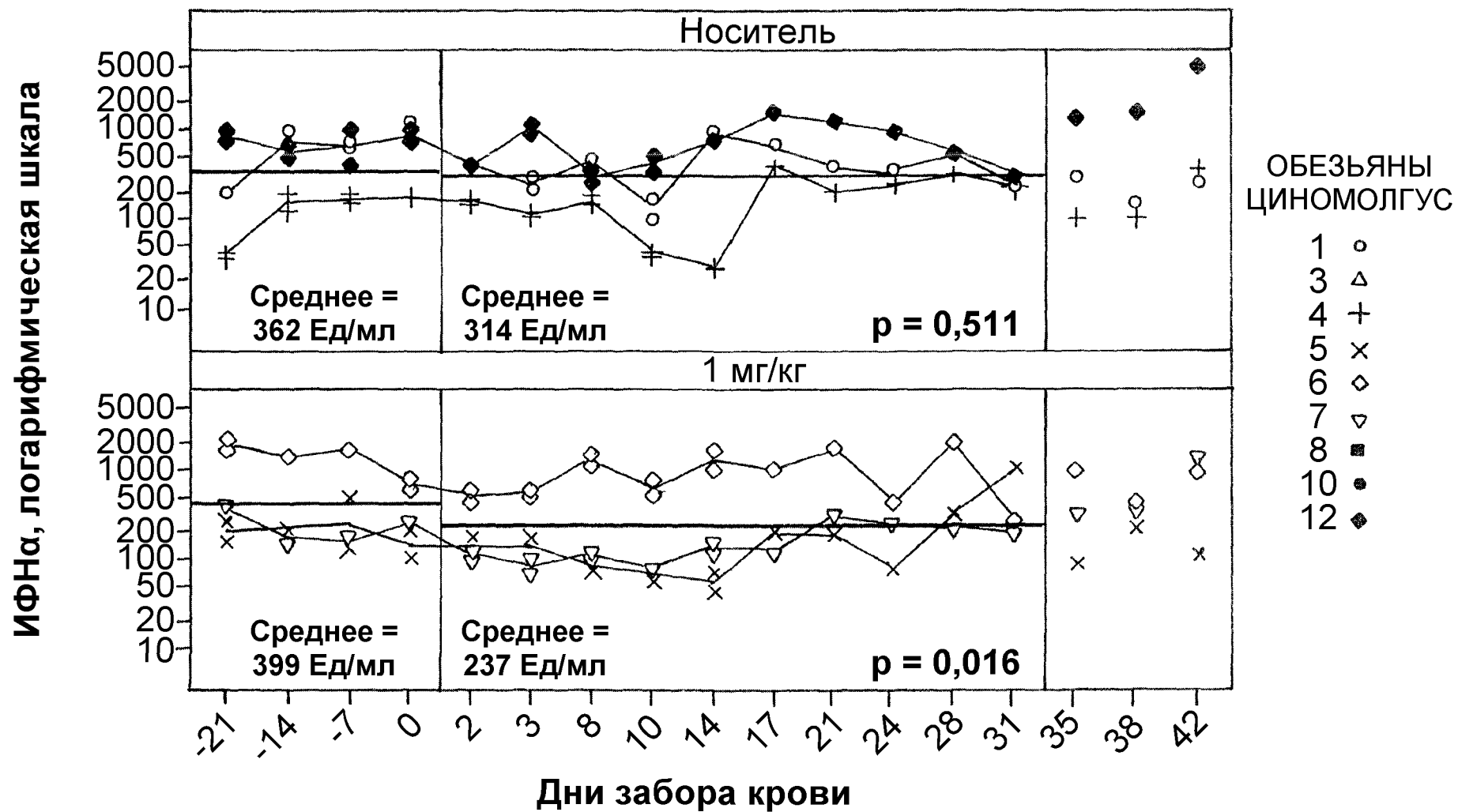
Схемы



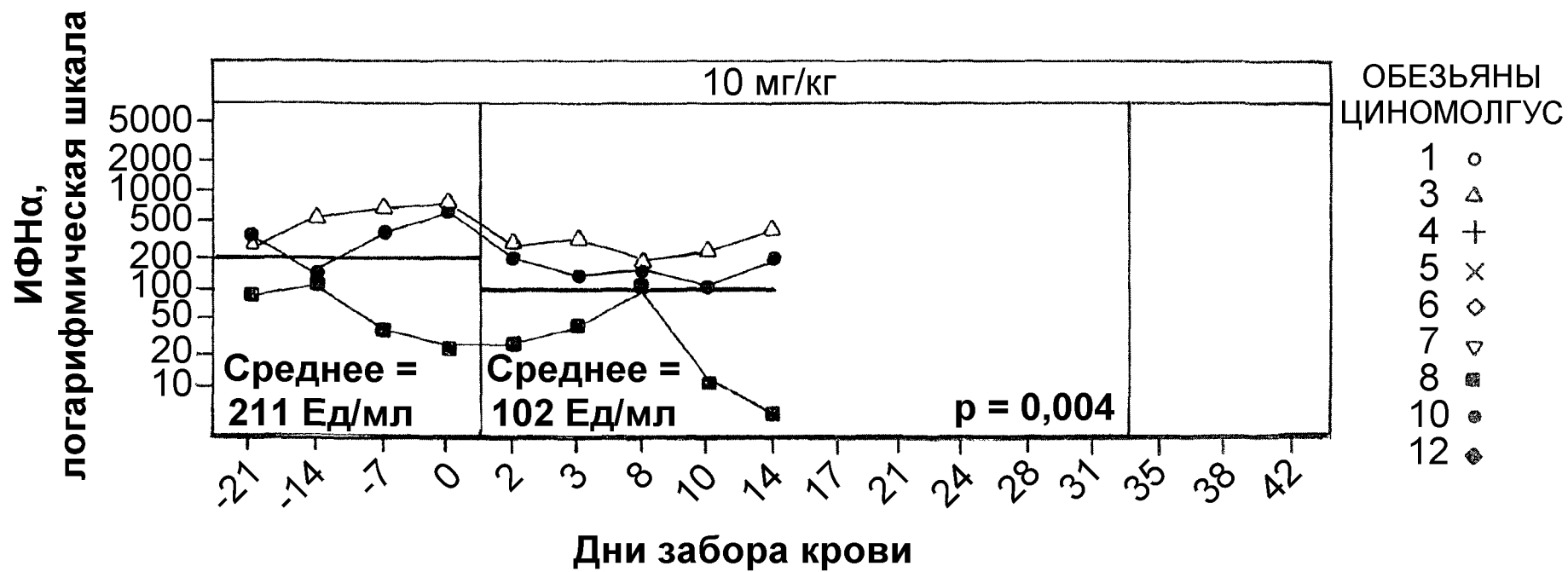
ФИГ.59



ФИГ.60-1



ФИГ.60-2



ФИГ.61

