

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090727 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.15

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.09.11

(54) ВАРИАНТЫ АНТИТЕЛ

(31) 17191988.9

(32) 2017.09.19

(33) EP

(86) PCT/EP2018/074523

(87) WO 2019/057565 2019.03.28

(71) Заявитель:
ТИЛЛОТТС ФАРМА АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Фуррер Эстер Мария (CH)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с TNF α и проявляют модифицированное FcRn-связывание. Антитела согласно изобретению имеют хорошие эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства.

A1

202090727

202090727

A1

ВАРИАНТЫ АНТИТЕЛ

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к модифицированным антителам, имеющим улучшенные эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства. Антитела пригодны для терапевтического лечения различных нарушений, в особенности, воспалительных заболеваний.

10 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

За последние 20 лет моноклональные антитела приобрели возрастающую значимость в качестве терапевтических реагентов в клинической медицине. В течение многих лет, попытки улучшить антитела сосредотачивались на уменьшении их потенциальной иммуногенности, что приводило к получению гуманизированных или даже полностью человеческих антител. Другой подход нацелен на оптимизацию антител путем улучшения их эффекторных функций. В то время как прямые эффекты опосредованы переменными антигенсвязывающими участками антител, то не прямые эффекты опосредованы константной Fc областью. Попытки улучшить эффекторные функции главным образом сосредоточены на модуляции Fc области. Кроме того, желательным является улучшение времени полужизни в сыворотке крови терапевтических антител, что может уменьшать количество требуемых антител, и может увеличивать их пригодность для пациентов путем пролонгирования интервалов лечения.

25 Для применений в терапевтических целях, иммуноглобулин G (IgG) является предпочтительным классом выбора по следующим причинам; IgG легко очищать, они относительно стабильны при хранении, могут вводиться внутривенно, имеют удлиненное биологическое время полужизни *in vivo* и способны оказывать различные биологические эффекторные функции, такие как активация комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и захват эффекторных клеток путем различных взаимодействий Fc-рецепторов (антителозависимая клеточная цитотоксичность; ADCC). Из пяти классов иммуноглобулинов, IgG проявляет наибольшее биологическое время полужизни вследствие его уникального взаимодействия с IgG рецептором рециклинга, неонатальным Fc

рецептором (FcRn). Одной из известных функций рецептора является спасение IgG от каталитического разложения. Для растворенной FcRn-Fc сокристаллической структуры было показано, что взаимодействие с Fc происходит в IgG шарнирном-С_H2-С_H3 участке. Это взаимодействие происходит в условиях, жестко зависящих от значения pH, а именно при кислом pH 6,0-6,5 в эндосомах. Связанные IgG молекулы снова возвращаются на клеточную поверхность, где они высвобождаются при физиологическом значении pH 7,4 в циркуляцию, в то время как молекулы IgG, не образовавшие комплексы, поступают на лизосомное разложение. Этот кругооборот представляет собой механизм для увеличения времени полужизни IgG; следовательно, модуляция взаимодействия FcRn-IgG будет предоставлять возможность специфического контроля времени полужизни в сыворотке крови для гамма-иммуноглобулинов и Fc-слитых белков.

В зависимости от применения, может являться желательным увеличивать или уменьшать время нахождения IgG в сыворотке. Для терапевтического применения, желательным является более длительное время полужизни, поскольку потребуются меньшие дозы и меньшее количество инъекций. Было исследовано несколько подходов для увеличения времени полужизни, включая применение полиэтиленгликоля (ПЭГ), создание альбумин- или Fc-слитых белков и усиление FcRn-IgG взаимодействия. ПЭГилированные фармацевтические препараты используются в клинических условиях с 1990 г. и ПЭГилирование является хорошо отработанной технологией для удлинения нахождения лекарственного средства в крови. Поскольку человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) также циркулирует повторно через FcRn с помощью pH-зависимого взаимодействия, то также были созданы несколько альбумин-слитые белки для усиления стабильности и времени полужизни. Дополнительно, фрагменты антител, слитые с альбумином или альбуминсвязывающими доменами, продемонстрировали пролонгированное время нахождения в сыворотке в доклинических исследованиях. Создание Fc-слитых белков является другой стратегией, которая будет обеспечивать белки или пептиды со свойствами, сходными с интактным антителом.

Модификации Fc области, которые были исследованы, обобщены в Saxena (2016) *Frontiers in Immunology*, том 7, статья 580. Различные Fc мутации также

описаны в WO 1998/023289 A1, WO 2000/042072 A2, WO 2010/106180 A2 и WO 2014/108198 A1.

Существует неудовлетворённая потребность в антителах, имеющих улучшенные эффекторные функции и/или фармакокинетики.

5

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретатели настоящего изобретения обнаружили, что определенные специфические мутации в Fc области антитела повышают аффинность антитела к FcRn при pH 6, в то время как аффинность при pH 7,4 остается низкой. Антитела, имеющие мутации, обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами. Кроме того, предпочтительные варианты антител согласно настоящему изобретению имеют лучшее ингибирование пролиферации Т-клеток по сравнению с их соответствующими исходными антителами дикого типа.

Следовательно, изобретение относится к объектам, определенным в последующих абзацах [1] - [91]:

[1] Антитело, содержащее TNF α -связывающий домен и FcRn-связывающий сайт, имеющее высокую аффинность к FcRn человека при pH 6, указанная высокая аффинность характеризуется константой равновесия при диссоциации (K_D) меньше чем 500 нМ, и дополнительно имеющее низкую аффинность к FcRn человека при pH 7,4, указанная низкая аффинность характеризуется K_D больше чем 1 мкМ, где аминокислотная последовательность антитела содержит аминокислоты 380A и 434A.

[2] Антитело согласно пункту [1], где антитело получают путем замены аспарагина на аланин в положении 434 (N434A).

[3] Антитело согласно пункту [1] или [2], где антитело получают путем замены глутаминовой кислоты на аланин в положении 380 (E380A).

[4] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где аминокислота в положении 307 аминокислотной последовательности антитела отличается от аланина.

[5] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность антитела дополнительно содержит аминокислоту 307T.

[6] Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:13.

[7] Антитело по любому из предыдущих пунктов, имеющее аффинность к FcRn человека при pH 6, которая является больше, чем такая аффинность инфликсимаба (IFX).

[8] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная высокая аффинность к FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D меньше чем 400 нМ.

[9] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная высокая аффинность к FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D меньше чем 300 нМ.

[10] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная высокая аффинность к FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D меньше чем 200 нМ.

[11] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная высокая аффинность к FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D меньше чем 150 нМ.

[12] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная высокая аффинность к FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D в диапазоне от 5 нМ до 500 нМ, или от 10 нМ до 400 нМ, или от 25 нМ до 300 нМ, или от 50 нМ до 200 нМ, или от 75 нМ до 150 нМ.

[13] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанную K_D , характеризующую высокую аффинность при pH 6, определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[14] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная низкая аффинность к FcRn человека при pH 7,4 характеризуется K_D больше чем 10 мкМ.

[15] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанную K_D , характеризующую низкую аффинность к FcRn человека при pH 7,4, определяют с помощью SPR.

[16] Антитело по любому из пунктов [1] - [13], где аффинность к FcRn человека при pH 7,4 является настолько низкой, что K_D значение не может быть определено с помощью SPR.

[17] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α человека с K_D меньше чем 200 пМ.

[18] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α человека с K_D меньше чем 100 пМ.

[19] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α человека с K_D меньше чем 50 пМ.

[20] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α человека с K_D меньше чем 25 пМ.

5 [21] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α человека с K_D меньше чем 10 пМ.

[22] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону.

10 [23] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону в бóльшем количестве, чем контрольное антитело, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:1, и тяжелую цепь, имеющую
15 аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:2.

[24] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону в бóльшем количестве по сравнению с инфликсимабом.

20 [25] Антитело согласно пункту [24], где количество антитела, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, в два раза превышает количество инфликсимаба, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой.

[26] Антитело по любому из пунктов [23] - [25], где указанное
25 количество относится к массе антитела, транспортируемой через поляризованный клеточный монослой в течение четырех часов.

[27] Антитело по любому из пунктов [22] - [26], где количество антитела, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, в два
30 раза превышает количество исходного иммуноглобулина, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, где указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что его Fc область имеет только аминокислоты дикого типа.

[28] Антитело по любому из пунктов [22] - [27], где количество антитела, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, в два

раза превышает количество исходного иммуноглобулина, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, где указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что он содержит аминокислоты 380E и 434N.

5 [29] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где бóльшее количество в процентах антитела по сравнению с инфликсимабом транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону в присутствии десятикратного избытка конкурирующих иммуноглобулинов, где количество в процентах относится к
10 общей массе иммуноглобулинов, транспортируемых через поляризованный клеточный монослой.

[30] Антитело согласно пункту [29], где количество в процентах антитела, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, в два
15 раза больше количества в процентах исходного иммуноглобулина, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, где указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что его Fc область имеет только аминокислоты дикого типа.

[31] Антитело согласно пункту [29] или [30], где количество в процентах антитела, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, в два
20 раза больше количества в процентах исходного иммуноглобулина, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, где указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что он содержит аминокислоты 380E и 434N.

[32] Антитело по любому из пунктов [22] - [31], где указанный
25 поляризованный клеточный монослой представляет собой монослой поляризованных T84 клеток.

[33] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с CD64 с K_D меньше чем 100 нМ, предпочтительно меньше чем 10 нМ.

[34] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с
30 CD32a(H) с K_D меньше чем 10 мкМ.

[35] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с CD32a(R) с K_D меньше чем 10 мкМ.

[36] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с CD32b с K_D меньше чем 10 мкМ.

[37] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с CD16a(V) с K_D меньше чем 1000 нМ, предпочтительно меньше чем 100 нМ.

[38] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с CD16a(F) с K_D меньше чем 10 мкМ, предпочтительно меньше чем 1 мкМ.

5 [39] Антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающееся с CD16b(NA2) с K_D меньше чем 10 мкМ, предпочтительно меньше чем 1 мкМ.

[40] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое способно связываться с C1q человека.

10 [41] Антитело по любому из предыдущих пунктов, имеющее комплементзависимую цитотоксичность (CDC) комплемента кролика.

[42] Антитело по любому из предыдущих пунктов, имеющее антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

[43] Антитело по любому из предыдущих пунктов, способное индуцировать CD14+CD206+ макрофаги.

15 [44] Антитело по любому из предыдущих пунктов, способное индуцировать CD14+CD206+ макрофаги на уровне, равном или больше по сравнению с инфликсимабом.

[45] Антитело по любому из предыдущих пунктов, способное подавлять пролиферацию Т-клеток.

20 [46] Антитело по любому из предыдущих пунктов, способное подавлять пролиферацию Т-клеток в степени, равной или больше по сравнению с инфликсимабом.

[47] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой не-фукозилированное антитело или антитело, имеющее уменьшенное
25 фукозилирование.

[48] Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее (I) V_L домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:3, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:4, и CDR3
30 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:5, и (II) V_H домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:6, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:7, и CDR3

участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:8.

[49] Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее V_H домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:9 и V_L домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:10.

[50] Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:1 и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:11.

[51] Антитело по любому из пунктов [1] - [47], где указанное антитело содержит (I) V_L домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:14, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:15, и CDR3 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:16, и (II) V_H домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:17, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:18, и CDR3 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:19.

[52] Антитело согласно пункту [51], содержащее V_H домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:20 и V_L домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:22.

[53] Антитело согласно пункту [51] или [52], содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:24, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:12.

[54] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело специфически связывается с TNF α человека.

[55] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело существенно не связывается с TNF β .

[56] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело

(I) связывается с TNF α человека с константой диссоциации (K_D) меньше чем 125 пМ;

(II) перекрестно реагирует с TNF α *Macaca mulatta* и с TNF α *Macaca fascicularis*;

5 (III) имеет бóльшую эффективность по сравнению с инфликсимабом, как определено с помощью L929 анализа; и/или

(IV) способно связываться с TNF α _{Тример} человека при стехиометрии (антитело : TNF α _{Тример}) по меньшей мере 2.

10 [57] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α из *Macaca mulatta* с K_D меньше чем 1 нМ.

[58] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α из *Macaca fascicularis* с K_D меньше чем 1 нМ.

15 [59] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где активность антитела ингибировать TNF α -индуцированный апоптоз по сравнению с такой активностью инфликсимаба (относительная активность), определенной в L929 анализе, составляет больше 3, и где указанная относительная активность представляет собой соотношение IC₅₀ значения в нг/мл инфликсимаба в L929 анализе к IC₅₀ значению в нг/мл антитела в L929 анализе.

20 [60] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где температура плавления переменного домена антитела в scFv формате, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 65°C.

25 [61] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где температура плавления переменного домена антитела в scFv формате, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 68°C.

[62] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где температура плавления, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 70°C.

30 [63] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело способно блокировать взаимодействие между TNF α человека и рецептором I TNF(TNFR1).

[64] Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело способно блокировать взаимодействие между TNF α человека и рецептором II TNF (TNFRII).

5 [65] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое способно ингибировать LPS-индуцированную секрецию интерлейкина-1 β из CD14⁺ моноцитов.

[66] Антитело согласно пункту [65], где IC₅₀ значение для ингибирования LPS-индуцированной секреции интерлейкина-1 β составляет меньше чем 1 нМ.

10 [67] Антитело согласно пункту [66], где указанной IC₅₀ значение для ингибирования LPS-индуцированной секреции интерлейкина-1 β , на молярном основании, является ниже по сравнению с таким значением адалимумаба.

[68] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое способно ингибировать LPS-индуцированную секрецию TNF α из CD14⁺ моноцитов.

15 [69] Антитело согласно пункту [68], где IC₅₀ значение для ингибирования LPS-индуцированной секреции TNF α составляет меньше чем 1 нМ.

[70] Антитело согласно пункту [69], где указанное IC₅₀ значение для ингибирования LPS-индуцированной секреции TNF α , на молярном основании, является ниже по сравнению с таким значением адалимумаба.

[71] Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой иммуноглобулин G (IgG), предпочтительно IgG1.

[72] Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предыдущих пунктов.

25 [73] Вектор или плазида, содержащий (ая) нуклеиновую кислоту согласно пункту [72].

[74] Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту согласно пункту [72] или вектор или плазмиду согласно пункту [73].

30 [75] Способ приготовления антитела по любому из пунктов [1] - [71], включающий культивирование клетки по пункту [74] в среде, которая предоставляет возможность экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и восстановление антитела из клеток или из среды.

[76] Антитело, как определено в любом из пунктов [1] - [71], для применения в способе лечения воспалительного нарушения или нарушения, связанного с TNF α .

5 [77] Антитело для применения по пункту [76], где указанное воспалительное нарушение выбирают из перечня заболеваний и нарушений, перечисленных в Разделе “*Нарушения, подвергаемые лечению*” ниже.

[78] Антитело для применения по пункту [76], где указанное воспалительное нарушение представляет собой воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта.

10 [79] Антитело для применения по пункту [78], где указанное воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

[80] Антитело для применения по пункту [78] или [79], где указанное воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта представляет собой
15 болезнь Крона.

[81] Антитело для применения по пункту [80], где указанную болезнь Крона выбирают из группы, включающей подвздошную, толстокишечную, тонкотолстокишечную и/или изолированную верхнюю болезнь Крона (желудочную, дуоденальную и/или тощекишечную) и включая
20 нестриктурирующее-непенетрирующее, стриктурирующее, пенетрирующее и перианальное поведение заболевания, предоставляющий возможность любой комбинации локализации и поведения заболевания любых из вышеуказанных.

[82] Антитело для применения по пункту [78] или [79], где указанное воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта представляет собой
25 язвенный колит.

[83] Антитело для применения по пункту [82], где указанный язвенный колит выбирают из группы, включающей язвенный проктит, сигмоидит, проктосигмоидит, левосторонний колит, пан-язвенный колит и резервуарный илеит.

30 [84] Антитело для применения по пункту [78] или [79], где указанное воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта представляет собой микроскопический колит.

[85] Антитело для применения по пункту [76], где указанное воспалительное нарушение представляет собой артрит.

[86] Антитело для применения по пункту [76] или [85], где указанное воспалительное нарушение ревматоидный артрит.

[87] Антитело для применения по любому из пунктов [76] - [86], где указанный способ включает пероральное введение антитела субъекту.

5 [88] Антитело для применения по любому из пунктов [76] - [87], где указанный способ включает местное применение антитела.

[89] Фармацевтическая композиция, которая содержит антитело по любому из пунктов [1] - [71].

10 [90] Способ улучшения транскитоza антитела, направленного на TNF α , включающий интродуцирование замен E380A и N434A в аминокислотной последовательности антитела.

[91] Способ увеличения периода полужизни в плазме антитела, направленного на TNF α , включающий интродуцирование замен E380A и N434A в аминокислотной последовательности антитела.

15 **Описание фигур**

Фигура 1: Активность вариантов антител TNF α на нейтрализацию TNF α человека в L929 анализе. Показаны кривые зависимости «доза-эффект» для TNF α -специфических TP антител и сравнительного инфликсимаба.

20 Фигура 2: Транспорт IgG вариантов к TNF α через поляризованные T84 клетки. Количества вариантов антител к TNF α и IFX из апикального в базолатеральный резервуар через 4 часа после добавления. Представлены в виде нг/см². Планки погрешностей указывают СО двух из четырех индивидуальных монослоев.

25 Фигура 3: Транспорт IgG вариантов к TNF α через поляризованные T84 клетки в присутствии избыточных количеств миеломного IgG. Количества анти-TNF α IFX и Ab вариантов, транспортируемые из апикального в базолатеральный резервуар в присутствии 10-кратного избытка IgG миеломы человека через 4 часа после добавления. Представлены в виде нг/см². Планки погрешностей указывают СО трех из четырех индивидуальных монослоев.

30 Фигура 4: ADCC активность. Индукция ADCC с помощью вариантов антител к TNF α и антитела дикого типа.

Фигура 5: Связывание с C1q человека. Связывание IFX и вариантов антител к TNF α с C1q человека. Каждую концентрацию анализировали в двух повторах. Планки погрешностей указывают СО.

Фигура 6: Индукция $CD14^+CD206^+$ макрофагов с помощью каждого соединения по сравнению с индукцией, вызванной IFX. Обобщенные данные для 4 независимых экспериментов. Столбики представляют среднее значение, планки погрешностей представляют СПС.

5 Фигура 7: Супрессия пролиферации Т-клеток с помощью каждого соединения по сравнению с IFX. Обобщенные данные для 3 независимых экспериментов. Столбики представляют среднее значение, планки погрешностей представляют СПС.

Фигура 8: Схематическая презентация сайт-направленного мутагенеза.

10 Фигура 9: Схематическая иллюстрация доминирования форм N-гликана, присоединенных к N297 вариантов антител к TNF α . Два профиля N-гликана, которые доминируют на панели тестируемых вариантов антител к TNF α , представляли собой 4GlcNac-1Fuc-3Man и 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal, в то время как для IgG вариантов, продуцируемых в присутствии 2FF, встречаются такие же
15 двухантенные структуры, за исключением тех, в которых отсутствует фукоза.

Подробное описание изобретение

Настоящее изобретение относится к антителу, которое способно связываться с TNF α и содержит FcRn-связывающий сайт. В соответствии с этим применением, антитело содержит FcRn-связывающий сайт, если оно способно
20 связываться с FcRn, предпочтительно с FcRn человека, при pH 6. Связывание с FcRn при pH 6 может быть определено с помощью SPR, например, как описано в Примере 4 настоящей заявки. Если связывание антитела с FcRn при pH 6 может быть определено с помощью SPR, то такое антитело имеет FcRn связывающий сайт. Антитело согласно изобретению имеет высокую аффинность к FcRn
25 человека при pH 6, которая характеризуется константой равновесия при диссоциации (K_D) меньше чем 500 нМ. Антитело дополнительно имеет низкую аффинность к FcRn человека при pH 7,4, которая характеризуется K_D больше чем 1 мкМ. Аминокислотная последовательность антитела содержит аминокислоту аланин в положении 380 и в положении 434 (EU нумерация).

30 Для всего описания настоящей заявки и пунктов формулы изобретения, в общем случае используется система нумерации Кэбота при ссылке на остаток в переменном домене (приблизительно, остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (Kabat и др., *Sequences of Immunological Interest*. 5-ое изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). “EU

система нумерации” или “EU индекс” используется в общем случае при ссылке на остаток в константной области тяжелой цепи иммуноглобулин (например, EU индекс, описанный в Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) специально включенная в настоящую заявку в качестве ссылки). Если в настоящей заявке специально не указано иначе, то ссылки на номера остатков в переменном домене антител обозначают остаток, пронумерованный согласно системе нумерации Кэбота. Если в настоящей заявке специально не указано иначе, то ссылки на номера остатков в константном домене антител обозначают остаток, пронумерованный согласно системе нумерации EU (см., например, WO 2006/073941).

Антитело

В контексте настоящей заявки, термин “антитело” используется как синоним для “иммуноглобулина” (Ig), который определяется как белок, принадлежащий к классу IgG, IgM, IgE, IgA, или IgD (или любому его подклассу), и включает все обычные известные антитела и его функциональные фрагменты. В контексте настоящего изобретения, “функциональный фрагмент” антитела/иммуноглобулина определяется как антигенсвязывающий фрагмент или другое производное исходного антитела, который (ое) по существу сохраняет одно или несколько свойств такого исходного антитела. “Антигенсвязывающий фрагмент” или “антигенсвязывающий домен” антитела/иммуноглобулина определяется как фрагмент (например, переменный участок IgG), который охраняет антигенсвязывающий участок. “Антигенсвязывающий участок” антитела обычно обнаруживается в одном или нескольких гиперпеременных участках антитела, то есть, CDR-1, -2, и/или -3 участках. Антитела настоящего изобретения могут являться частью би- или мультифункциональных конструкций.

Предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Термин “моноклональное антитело”, как используется в настоящей заявке, не ограничиваются антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Термин “моноклональное антитело” относится к антителу, которое имеет происхождение от одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, и не ограничивается способом, с помощью которого оно получено. Моноклональные антитела могут быть получены при

использовании широкого разнообразия методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомной, рекомбинантной методики и способа фагового дисплея или их комбинации. (Harlow и Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.).

5 В других вариантах осуществления, включая варианты осуществления, относящиеся к применению *in vivo* антител к TNF α у людей, можно использовать химерные, приматизированные, гуманизированные или человеческие антитела. В предпочтительном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело, более предпочтительно
10 моноклональное антитело человека или моноклональное гуманизированное антитело.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело согласно изобретению представляет собой иммуноглобулин, предпочтительно иммуноглобулин G (IgG). Подкласс IgG согласно изобретению не
15 ограничивается и включает IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Предпочтительно, IgG согласно изобретению представляет собой подкласс 1, 2 или 4, то есть он представляет собой молекулу IgG₁, IgG₂ или IgG₄, соответственно. Наиболее предпочтительно, IgG согласно изобретению представляет собой подкласс 1, то есть он представляет собой молекулу IgG₁.

20 *TNF α -связывающий домен*

TNF α -связывающий домен антитела согласно изобретению предпочтительно не ограничивается. Он может иметь происхождение из любого антитела, которое способно связываться с TNF α .

Предпочтительно, антитело согласно изобретению специфически
25 связывается с TNF α . Как используется в настоящей заявке, антитело "специфически распознает", или "специфически связывается с " TNF α человека, когда антитело способно различать между TNF α человека и одной или несколькими сравнительными молекулами. Предпочтительно, IC₅₀ значение для связывания с каждой из сравнительных молекул является по меньшей мере в
30 1000 раз выше, чем IC₅₀ значение для связывание с TNF α . В его наиболее общей форме (и если не указано определенной ссылки), "специфическое связывание" относится к способности антитела различать между TNF α человека и неродственной биомолекулой, как определено, например, в соответствии с методами анализа специфичности, известными в данной области техники. Такие

методы включают, но не ограничиваясь только ими, вестерн-блоттинги и тесты ELISA. Например, можно проводить стандартный анализ ELISA. Обычно, определение специфичности связывания осуществляют путем применения не единичной сравнительной биомолекулы, а набора из около трех-пяти
 5 неродственных биомолекул, таких как сухое молоко, БСА, трансферрин или другие. В одном варианте осуществления, специфическое связывание относится к способности антитела различать между TNF α человека и TNF β человека.

Антитело согласно изобретению содержит V_L домен и V_H домен. V_L домен содержит CDR1 участок (CDRL1), CDR2 участок (CDRL2), CDR3 участок
 10 (CDRL3) и каркасные участки. V_H домен содержит CDR1 участок (CDRH1), CDR2 участок (CDRH2), CDR3 участок (CDRH3) и каркасные участки.

Термин “CDR” относится к одному из шести гипервариабельных участков в пределах вариабельных доменов антитела, которые гласным образом способствуют связыванию антигена. Одно из наиболее часто используемых
 15 определений для шести CDR представлено Kabat E. A. и др., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH публикация 91-3242), как используется в настоящей заявке, определение Кэбота для CDR применяется только для CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи (CDR L1, CDR L2, CDR L3, или L1, L2, L3), а также для CDR2 и CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи
 20 (CDR H2, CDR H3, или H2, H3). Тем не менее, CDR1 вариабельного домена тяжелой цепи (CDR H1 или H1), как используется в настоящей заявке, определяется по следующим остаткам (номенклатура Кэбота): Он начинается от положения 26 и заканчивается до положения 36.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело
 25 согласно изобретению представляет собой антитело к TNF α , как описано в любой из РСТ публикаций РСТ/EP2017/056218, РСТ/EP2017/056246, РСТ/EP2017/056237 и РСТ/EP2017/056227, как было подано изначально. В еще другом варианте осуществления настоящего изобретения, антитело представляет собой антитело к TNF α с вариабельным доменом легкой цепи и/или
 30 вариабельным доменом тяжелой цепи, содержащими участки, определяющие комплементарность (CDR) с аминокислотными последовательностями, как определено в РСТ заявках РСТ/EP2017/056218, РСТ/EP2017/056246, РСТ/EP2017/056237 и РСТ/EP2017/056227, как было подано изначально.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело представляет собой антитело к TNF α с переменным доменом легкой цепи и/или переменным доменом тяжелой цепи, содержащими один или несколько CDR с аминокислотными последовательностями как определено в

5 PCT/EP2017/056218, PCT/EP2017/056246, PCT/EP2017/056237, или PCT/EP2017/056227. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело представляет собой антитело к TNF α с переменным доменом легкой цепи и переменным доменом тяжелой цепи, содержащими CDR с аминокислотными последовательностями, как определено в

10 пункте 2 заявки PCT/EP2017/056218, в пункте 2 заявки PCT/EP2017/056246, в пункте 2 заявки PCT/EP2017/056237 или в пункте 2 PCT/EP2017/056227, как было подано изначально. В еще другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело к TNF α выбирают из группы, включающей антитела к TNF α , содержащие аминокислотную

15 последовательность переменного домена тяжелой цепи и/или аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи по пункту 4 заявки PCT/EP2017/056218, пунктов формулы изобретения 5 и 6 заявки PCT/EP2017/056246, пунктов формулы изобретения 5 и 6 заявки PCT/EP2017/056237, пункта 4 заявки PCT/EP2017/056227, и их комбинации.

20 Раскрытие каждой из этих международных патентных заявок PCT/EP2017/056218, PCT/EP2017/056246, PCT/EP2017/056237 и PCT/EP2017/056227 полностью включено в настоящую заявку в качестве ссылки. Они составляют часть раскрытия настоящей заявки.

В предпочтительном варианте осуществления, антитело согласно

25 изобретению содержит (I) V_L домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:3, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:4, и CDR3 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:5, и (II) V_H домен, содержащий CDR1 участок, имеющий

30 аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:6, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:7, и CDR3 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:8.

В более предпочтительном варианте осуществления, антитело согласно изобретению содержит V_H домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:9. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело содержит V_L домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:10. Наиболее предпочтительно, антитело согласно изобретению содержит (I) V_H домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:9, и (II) V_L домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:10.

В другом предпочтительном варианте осуществления, антитело согласно изобретению содержит (I) V_L домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:14, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:15, и CDR3 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:16, и (II) V_H домен, содержащий CDR1 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:17, CDR2 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:18, и CDR3 участок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:19.

В более предпочтительном варианте осуществления, антитело согласно изобретению содержит V_H домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:20. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело содержит V_L домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:22. Наиболее предпочтительно, антитело согласно изобретению содержит (I) V_H домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:20, и (II) V_L домен, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:22.

Антитело согласно изобретению имеет высокую аффинность к TNF α человека. Термин “ K_D ,” относится к константе равновесия при диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Обычно, антитело согласно изобретению связывается с TNF α человека с константой равновесия при диссоциации (K_D) меньше чем приблизительно 2×10^{-10} М, предпочтительно меньше чем $1,5 \times 10^{-10}$ М, предпочтительно меньше чем $1,25 \times 10^{-10}$ М, более

предпочтительно меньше чем 1×10^{-10} М, наиболее предпочтительно меньше чем $7,5 \times 10^{-11}$ М или еще меньше чем 5×10^{-11} М, как определено с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE. В частности, определение K_D осуществляют, как описано в Примере 1.

5

Модификации, оказывающие влияние на аффинность к FcRn

Антитело согласно изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от такой нативной последовательности антитела дикого типа благодаря по меньшей мере одной “аминокислотой модификации”, как определено в настоящей заявке. По меньшей мере одна аминокислотная модификация оказывает влияние на аффинность антитела к FcRn человека. Обычно, по меньшей мере одна аминокислотная модификация увеличивает аффинность антитела к FcRn человека при pH 6. В одном варианте осуществления, по меньшей мере одна аминокислотная модификация увеличивает аффинность антитела к FcRn человека при pH 6, где она существенно не изменяет аффинность к FcRn человека при pH 7,4. Предпочтительно, модифицированное антитело имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью антитела дикого типа или исходного антитела, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен. Предпочтительно, по меньшей мере одна аминокислотная модификация находится в пределах FcRn связывающего сайта антитела. Антитело может иметь одну или несколько аминокислотных модификаций за пределами FcRn связывающего сайта антитела, которые оказывают влияние на FcRn связывание, например, путем структурных изменений. Аминокислотная (ые) модификация (и) могут быть созданы с помощью методов, которые известны *per se*, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза, как описано в “Antibodies Engineering – Methods and Protocols”, под редакцией Patrick Chames, 2-ое изд., 2012, Раздел 31 (ISBN 978-1-61779-973-0).

Антитело согласно изобретению содержит аминокислоту аланин в положении 380 и в положении 434 (EU нумерация). Это обозначается как “380A” и “434A” в настоящей заявке. Нативная аминокислота в положении 380 немодифицированного IgG антитела человека представляет собой глутаминовую

кислоту (E). Нативная аминокислота в положении 434 немодифицированного IgG антитела человека представляет собой аспарагин (N). Таким образом, антитело согласно изобретению может быть получено путем интродуцирования мутаций E380A и N434A в антитело. Предпочтительно, антитело согласно изобретению получают или получено путем замены глутаминовой кислоты на аланин в положении 380, и аспарагина на аланин в положении 434.

Оставшаяся аминокислотная последовательность Fc домена может быть идентичной нативной аминокислотной последовательности типичного IgG человека. Тем не менее, представляется возможным, что аминокислотная последовательность антитела содержит одну или несколько дополнительных мутаций или замен по сравнению с нативной аминокислотной последовательностью Fc области нативного антитела, до тех пор, пока антитело все еще будет иметь TNF α -связывающую активность, FcRn связывающую активность при pH 6,0 и одну или несколько эффекторных функций.

В предпочтительном варианте осуществления, Fc область антитела согласно изобретению, включая шарнирную область, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления, тяжелая цепь антитела согласно изобретению имеет аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:11. Предпочтительно, это антитело дополнительно содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:1.

В другом варианте осуществления, тяжелая цепь антитела согласно изобретению имеет аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:12. Предпочтительно, это антитело дополнительно содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:24.

В предпочтительном аспекте изобретения, антитело согласно изобретению представляет собой не-фукозилированное антитело или антитело, имеющее уменьшенное фукозилирование.

Термин “антитело, имеющее уменьшенное фукозилирование”, как используется в настоящей заявке, относится к антителу, в котором меньше чем 90% N-гликанов антитела являются фукозилированными. Способы определения процентного значения фукозилирования известны в данной области техники.

Предпочтительно, процентное значение фукозилирования определено, как описано в Примере 10 настоящей заявки.

В одном варианте осуществления, меньше чем 75%, или меньше чем 50%, или меньше чем 25% N-гликанов антитела являются фукозилированными.

5 Наиболее предпочтительно, меньше чем 10% N-гликанов антитела являются фукозилированными. В предпочтительном варианте осуществления, N-гликаны антитела согласно изобретению не содержат какой-либо фукозы.

Предпочтительно, меньше чем 90% N-гликанов в N297 (EU номенклатура) антитела являются фукозилированными. В другом варианте осуществления, 10 меньше чем 75%, или меньше чем 50%, или меньше чем 25% N-гликанов в N297 (EU номенклатура) антитела являются фукозилированными. Наиболее предпочтительно, меньше чем 10% N-гликанов в N297 (EU номенклатура) антитела являются фукозилированными.

В другом варианте осуществления, N-гликаны в N297 антитела не содержат 15 какой-либо фукозы.

Не-фукозилированные антитела, в некоторых случаях также обозначаемые как афукозилированные антитела, могут быть созданы с помощью различных методов. Например, синергетический нокдаун генов для α 1,6-фукозилтрансферазы (*FUT8*) и 4,6-дегидратазы GDP-маннозы (*GMD*) в CHO 20 клетках можно использовать для продуцирования вариантов моноклональных антител, которые являются полностью афукозилированными и ADCC-усиленными (см., например, Imai-Nishiya и др. (2007) BMC Biotechnol. 7, 84). Также можно использовать способ с применением нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN), отщепляющие *FUT8* ген в участке, кодирующем 25 каталитической ядро α 1,6-фукозилтрансферазы и разрушая таким образом соответствующую ферментативную функцию в CHO клетках для продуцирования моноклональных антител, в которых полностью отсутствует ядерная фукоза (см., например, Malphettes и др. (2010) Biotechnol. Bioeng. 106, 774–783).

30 Антитела, имеющее уменьшенное фукозилирование, могут быть приготовлены путем добавления субстрата ловушки, такого как 2-дезоксиде-2-фтор-2-фукоза в культуральную среду (см., например, Dekker и др. (2016) Sci Rep 6:36964), что приводит к уменьшенному включению фукозы в IgG-Fc гликаны.

В другом варианте осуществления, антитело согласно изобретению имеет высокое содержание сиаловой кислоты. Повышенное сиалирование может быть достигнуто, например, путем одновременной трансфекции цитидинмонофосфат-синтаза сиаловой кислоты (CMP-SAS), цитидинмонофосфат-транспортёр сиаловая кислота (CMP-SAT), и α 2,3-сиалилтрансфераз (см., например, Son и др. (2011) *Glycobiology* 21, 1019–1028).

Аффинность к FcRn

Аффинность при pH 6 к FcRn человека антитела согласно изобретению является высокой. Высокая аффинность связывания антитела к FcRn человека при pH 6 характеризуется K_D значением меньше чем 500 нМ. Предпочтительно, K_D значение высокой аффинности связывания при pH 6 составляет меньше чем 400 нМ, или меньше чем 300 нМ, или меньше чем 200 нМ. Например, K_D значение, характеризующее аффинность при pH 6, может находиться в диапазоне от 5 до 500 нМ, или от 10 до 400 нМ, или от 25 до 300 нМ, или от 50 до 200 нМ, или от 100 до 150 нМ.

В предпочтительном варианте осуществления, аффинность антитела согласно изобретению к FcRn человека при pH 6 является больше аффинности инфликсимаба к FcRn человека при pH 6,0.

Аффинность антитела согласно изобретению к FcRn человека предпочтительно определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, как описано в Примере 4 настоящей заявки.

Антитело настоящего изобретения обычно имеет низкую аффинность к FcRn человека при pH 7,4. Низкая аффинность характеризуется K_D значением больше чем 1 мкМ. Предпочтительно, низкая аффинность к FcRn человека при pH 7,4 характеризуется K_D значением больше чем 2 мкМ, или больше чем 5 мкМ, или больше чем 10 мкМ.

В предпочтительном варианте осуществления, низкая аффинность при pH 7,4 является настолько низкой, что K_D значение не может быть определено с помощью SPR.

В специальном варианте осуществления, соотношение (I) K_D значения для связывания антитела согласно изобретению к FcRn человека при pH 7,4 к (II) K_D значению для связывания с FcRn человека при pH 6,0, составляет по меньшей

мере 50. Предпочтительно, это соотношение составляет по меньшей мере 100, или по меньшей мере 150, или по меньшей мере 200.

Функциональные свойства антитела

Антитело согласно изобретению эффективно транспортируется через
 5 поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону. Обычно, транспорт через поляризованный клеточный монослой происходит в большем количестве, чем такой для инфликсимаба, где количество антитела для инфликсимаба относится к массе/см² поляризованного клеточного моноля. Количество антитела, транспортируемого через
 10 поляризованный клеточный монослой, по отношению к количеству инфликсимаба, транспортируемому через поляризованный клеточный монослой, составляет по меньшей мере 110%, предпочтительно по меньшей мере 120%, более предпочтительно по меньшей мере 130%, или по меньшей мере 140%, или по меньшей мере 150% (где количество транспортируемого инфликсимаба
 15 установлено равным 100%).

Кроме того, антитело специфически транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону в присутствии избытка конкурирующих иммуноглобулинов. Это обозначается как специфический транспорт в настоящей
 20 заявке.

Количество в процентах общей массы иммуноглобулинов, транспортируемых через поляризованный клеточный монослой составляет больше количество в процентах по сравнению с инфликсимабом, транспортируемым через поляризованный клеточный монослой из апикальной
 25 стороны на базолатеральную сторону в присутствии 10-кратного избытка конкурирующих иммуноглобулинов. Количество в процентах антитела согласно изобретению, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой в присутствии 10-кратного избытка неродственных иммуноглобулинов, по сравнению с количеством в процентах инфликсимаба, транспортируемого через
 30 поляризованный клеточный монослой в присутствии 10-кратного избытка неродственных антител, составляет по меньшей мере 120%, или по меньшей мере 130%, или по меньшей мере 140%, или по меньшей мере 150% (инфликсимаб установлен на 100%).

Предпочтительно, поляризованный клеточный монослой представляет собой монослой поляризованных Т84 клеток. Анализ транспорта, имитирующий процесс транцитоза, может быть осуществлен, как описано в Примере 5 настоящей заявки.

5 Антитело согласно изобретению связывается с CD64, CD32a(H), CD32a(R), CD32b, CD16a(V), CD16a(F) и CD16b(NA2).

Антитело согласно изобретению типично связывается с CD64 с K_D меньше чем 100 нМ, предпочтительно меньше чем 10 нМ.

10 Антитело согласно изобретению типично связывается с CD32a(H) с K_D меньше чем 10 мкМ.

Антитело согласно изобретению типично связывается с CD32a(R) с K_D меньше чем 10 мкМ.

Антитело согласно изобретению типично связывается с CD32b с K_D меньше чем 10 мкМ.

15 Антитело согласно изобретению типично связывается с CD16a(V), например, с K_D меньше чем 1 мкМ, предпочтительно меньше чем 500 нМ, более предпочтительно меньше чем 100 нМ.

Антитело согласно изобретению типично связывается с CD16a(F), например, с K_D меньше чем 10 мкМ, предпочтительно меньше чем 1 мкМ.

20 Антитело согласно изобретению типично связывается с CD16b(NA2), например, с K_D меньше чем 10 мкМ, предпочтительно меньше чем 1 мкМ.

Антитело согласно изобретению дополнительно связывается с C1q человека. Предпочтительно, сила этого связывания с C1q человека антитела согласно изобретению является по меньшей мере такой же прочной, как
25 связывание инфликсимаба с C1q человека.

Антитело согласно изобретению дополнительно имеет комплементзависимую цитотоксичность (CDC) компонента кролика.

Антитело согласно изобретению дополнительно способно индуцировать CD14⁺CD206⁺ макрофаги. Уровень индукции предпочтительно сопоставим с,
30 равен, или больше по сравнению с таким у инфликсимаба.

Антитело согласно изобретению дополнительно способно подавлять пролиферацию Т-клеток. Степень подавления пролиферации Т-клеток предпочтительно сопоставима с, равна, или больше по сравнению с такой у инфликсимаба.

Фармацевтические композиции и Лечение

Лечение заболевания охватывает лечение пациентов, которые уже были диагностированы как имеющие любую форму заболевания на любой клинической стадии или проявления; задержку начала или развития или
5 ухудшения или обострения симптомов или признаков заболевания; и/или предотвращения и/или уменьшения тяжести заболевания.

"Субъект" или "пациент", кому вводят антитело к TNF α , может представлять собой млекопитающее, такое как не-примат (например, корова, свинья, лошадь, кот, собака, крыса и т.д.) или примат (например, обезьяна или
10 человек). В определенных аспектах, человек представляет собой пациента детского возраста. В других аспектах, человек представляет собой взрослого пациента.

В настоящей заявке описаны композиции, содержащие антитело к TNF α и необязательно одно или несколько дополнительных терапевтических средств, таких как вторые терапевтические средства, описанные ниже. Композиции
15 обычно будут поставляться как часть стерильной, фармацевтической композиции, которая включает фармацевтически приемлемый носитель. Такая композиция может находиться в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа введения пациенту).

Антитела к TNF α могут вводиться пациенту различными путями, такими как перорально, трансдермально, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, интратекально, местно или локально, например, мукозально. Наиболее приемлемый путь введения в любом конкретном случае будет зависеть от конкретного антитела, субъекта, а также природы и тяжести заболевания и
25 физического состояния субъекта. Обычно, антитело к TNF α будет вводиться внутривенно.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, антитело согласно изобретению вводят перорально. Если введение осуществляют пероральным путем, то антитело предпочтительно представляет собой IgG, наиболее
30 предпочтительно IgG₁.

В типичных вариантах осуществления, антитело к TNF α содержится в фармацевтической композиции при концентрации, достаточной для осуществления внутривенное введение в дозе от 0,5 мг/кг веса тела до 20 мг/кг веса тела. В некоторых вариантах осуществления, концентрация антитела,

подходящая для применения в композициях и способах, описанных в настоящей заявке включает, но не ограничиваясь только ими, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, или концентрацию, находящуюся в диапазоне между любыми из вышеуказанных значений, например, 1 мг/кг - 10 мг/кг, 5 мг/кг - 15 мг/кг, или 10 мг/кг - 18 мг/кг.

Эффективная доза антитела к TNF α может находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 750 мг/кг на однократное (например, болюсное) введение, многократные введения или непрерывное введение, или для достижения концентрация в сыворотке 0,01-5000 мкг/мл на однократное (например, болюсное) введение, многократные введения или непрерывное введение, или любой эффективный диапазон или значение в нем, в зависимости от состояния, подвергаемого лечению, пути введения и возраста, веса и состояния субъекта. В случае перорального введения, концентрация в сыворотке может быть очень низкой или даже ниже предела обнаружения. В определенных вариантах осуществления, каждая доза может находиться в диапазоне от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 50 мг на килограмм веса тела или от приблизительно 3 мг до приблизительно 30 мг на килограмм веса тела. Антитело может быть приготовлено в виде водного раствора.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, антитело согласно изобретению вводят перорально. Если введение осуществляют пероральным путем, то антитело предпочтительно представляет собой IgG, наиболее предпочтительно IgG₁. Если антитело вводят перорально, то суточная доза антитела типично находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, или от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг веса тела, или от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, или от приблизительно 0,16 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг веса тела, или от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг веса тела, или от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг веса тела. В общем случае, благоприятные дозы представляют собой дозы от 1 до 200 мг в сутки, предпочтительно от 5 до 100 или от 10 до 50 мг в сутки.

Фармацевтические композиции могут быть подходяще представлены в виде единичных дозированных форм, содержащих предварительно определенное количество антитела к TNF α на дозу. Такая единица может содержать от 0,5 мг до 5 г, например, но не ограничиваясь, 1 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 750 мг, 1000 мг, или любой интервал между двумя вышеуказанными значениями, например, от 10 мг до 1000 мг, от 20 мг до 50 мг, или от 30 мг до 300 мг. Фармацевтически приемлемые носители могут быть разнообразной формы в зависимости, например, от состояния, подвергаемого лечению или пути введения.

Таким образом, определение эффективной дозы, общего количества доз и продолжительности лечения с применением антитела к TNF α находится в компетенции квалифицированного специалиста в данной области техники и легко может быть осуществлено с помощью стандартного исследования с повышением дозы.

Терапевтические препараты антител к TNF α , подходящие для применения в способах, описанных в настоящей заявке могут быть приготовлены для хранения в виде лиофилизированных композиций или водных растворов путем смешивания антитела, обладающего достаточной степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами, которые типично используются в области техники (они все обозначаются в данной заявке как “носители”), то есть, буферными агентами, стабилизирующими агентами, консервантами, изотоническими агентами, неионными детергентами, антиоксидантами и другими вспомогательными добавками. Смотри *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16-ое издание (Osol, ред. 1980). Такие добавки должны быть нетоксическими для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

Буферные агенты помогают поддерживать pH в интервале, который приближен к физиологическим условиям. Они могут присутствовать при концентрации, которая колеблется в интервале от приблизительно 2 mM до приблизительно 50 mM. Приемлемые буферные агенты включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, такие как цитратные буферы (например, смесь цитрат мононатрия - цитрат динатрия, смесь лимонная кислота - цитрат тринатрия, смесь лимонная кислота - цитрат мононатрия, и т.д.), цитратно-фосфатные буферы, сукцинатные буферы (например, смесь

янтарная кислота - сукцинат мононатрия, смесь янтарная кислота - гидроокись натрия, смесь янтарная кислота - сукцинат динатрия, и т.д.), тартратные буферы (например, смесь винная кислота - тартрат натрия, смесь винная кислота - тартрат калия, смесь винная кислота - гидроокись натрия, и т.д.), фумаратные буферы (например, смесь фумаровая кислота - фумарат мононатрия, смесь фумаровая кислота - фумарат динатрия, смесь фумарат мононатрия - фумарат динатрия, и т.д.), глюконатные буферы (например, смесь глюконовая кислота - глюконат натрия, смесь глюконовая кислота - гидроокись натрия, смесь глюконовая кислота - глюконат калия, и т.д.), оксалатный буфер (например, смесь щавелевая кислота - оксалат натрия, смесь щавелевая кислота - гидроокись натрия, смесь щавелевая кислота - оксалат калия, и т.д.), лактатные буферы (например, смесь молочная кислота - лактат натрия, смесь молочная кислота - гидроокись натрия, смесь молочная кислота - лактат калия, и т.д.) и ацетатные буферы (например, смесь уксусная кислота - ацетат натрия, смесь уксусная кислота - гидроокись натрия, и т.д.). Дополнительно могут использоваться фосфатные буферы, гистидиновые буферы и соли триметиламина, такие, как Трис.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну соль, например, хлорид натрия. Концентрация соли предпочтительно находится в диапазоне от 100 мМ до 200 мМ, например, приблизительно 150 мМ.

Консерванты могут прибавляться для задержки микробного роста, они могут прибавляться в количествах, которые находятся в диапазоне 0,2%-1% (вес./об.). Приемлемые консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метил парабен, пропил парабен, октадецилдиметилбензил аммоний хлорид, галиды бензалкония (например, хлорид, бромид и иодид), хлорид гексаметония и алкил парабены, такие как метил или пропил парабен, катехол, резорцинол, циклогексано́л и 3-пентано́л. Изотонические агенты, иногда известные как “стабилизаторы” могут прибавляться для обеспечения изотоничности жидких композиций и включают многоатомные сахарные спирты, предпочтительно трехатомные или более высокие сахарные спирты, такие как глицерин, эритритол, арабитол, ксилитол, сорбитол и маннитол. Стабилизаторы относятся к широкой категории наполнителей, которые могут варьировать по своей функции от объемообразующего агента до добавки,

которая солюбилизирует терапевтический агент или помогает предотвратить денатурацию или приклеивание к стенке контейнера. Типичные стабилизаторы могут представлять собой многоатомные сахарные спирты (перечислены выше); аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин, и т.д., органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахилоза, маннитол, сорбитол, ксилитол, рибитол, миоинозитол, галактитол, глицерол и тому подобное, включая циклитолы, такие как инозитол; полиэтиленгликоль; аминокислотные полимеры; содержащие серу восстанавливающие агенты, такие, как мочевины, глутатион, липоевая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерол, α -монотиоглицерол и тиосульфат натрия; полипептиды с низким молекулярным весом (например, пептиды из 10 остатков или меньше); белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие, как поливинилпирролидон; моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза и трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстран. Стабилизаторы могут присутствовать в интервале от 0,1 до 10000 весовых частей на весовую часть активного белка.

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как “смачивающие агенты”) могут прибавляться для того, чтобы помочь солюбилизовать терапевтический агент, а также для того, чтобы защитить терапевтический белок от индуцированной перемешиванием агрегации, что также помогает композиции подвергаться сдвигу поверхности без денатурации белка. Приемлемые неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188, и т.д.), полиолы Плурионика, моноэтеры полиоксиэтилен сорбитана (ТВИН®-20, ТВИН®-80, и т.д.). Неионные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в интервале от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл, или в диапазоне приблизительно от 0,07 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл. О

Дополнительные разнообразные наполнители могут включать структурообразующие агенты (например, крахмал), хелатирующие агенты (например, ЭДТА), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е) ингибиторы протеазы и сорастворители.

Препараты, описанные в настоящей заявке, также могут содержать второе терапевтическое средство, дополнительно к антителу к TNF α , описанному в настоящей заявке. Примеры подходящих вторых терапевтических средств представлены ниже.

5 Схема дозирования может колебаться от одного раз в месяц до ежедневно в зависимости от количества клинических факторов, включая тип заболевания, тяжесть заболевания, и чувствительность пациента к антителу к TNF α . В специфических вариантах осуществления, антитело к TNF α согласно настоящему изобретению вводят ежедневно, два раза в неделю, три раза в 10 неделю, через день, один раз в 5 дней, один раз в неделю, один раз в 10 дней, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели или один раз в месяц, или в любом интервале между любыми двумя из вышеуказанных значений, например, от один раз в 4 дня до один раз в месяц, от один раз в 10 дней до каждые две недели, или от двух до трех раз в неделю, и т.д.

15 Дозировка антитела к TNF α для введения будет изменяться в зависимости от конкретного антитела, субъекта и природы и тяжести заболевания, физического состояния субъекта, терапевтической схемы (например, от того, будет ли вводиться второе терапевтическое средство), и выбранного пути введения; подходящая дозировка легко может быть определена 20 квалифицированным специалистом в данной области техники.

Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятно, что оптимальная величина и распределение индивидуальных дозировок антитела к TNF α согласно изобретению будет определяться природой и степенью выраженности состояния, подвергаемого лечению, формой, путем и 25 местом введения, и возрастом и состоянием конкретного субъекта, подвергаемого лечению, и что в конечном итоге лечащий врач определит подходящие дозировки для применения. Эта дозировка может повторяться с подходящей периодичностью. Если развиваются побочные явления, то количество и/или частота дозировок может быть изменена или уменьшена, в 30 соответствии с обычной клинической практикой.

Нарушения, подвергаемые лечению

Изобретению относится к способу лечения или предотвращения заболевания, связанного с TNF α человека, у субъекта, включающего введение субъекту антитела, как определено в настоящей заявке. Термин “нарушение,

связанное с TNF α ”, или “заболевание, связанное с TNF α ”, относится к любому нарушению, началу, прогрессированию или персистированию симптомов или болезненных состояний, для которых требуется участие TNF α . Типичные примеры нарушений, связанных с TNF α , включают, но не ограничиваясь только ими, хронические и/или аутоиммунные состояния воспаления в целом, воспалительные нарушения, опосредованные иммунной системой, в целом, воспалительное заболевание ЦНС, воспалительные заболевания, поражающие глаза, суставы, кожу, слизистые мембраны, центральную нервную систему, желудочно-кишечный тракт, мочевыводящие пути или легкие, состояния увеита в целом, ретинит, HLA-B27+ увеит, болезнь Бехчета, синдром сухого глаза, глаукому, синдром Шегрена, сахарный диабет (вкл. диабетическую нейропатию), резистентность к инсулину, состояния артрита в целом, ревматоидный артрит, остеоартрит, реактивный артрит и синдром Рейтера, ювенильный артрит, анкилозирующий спондилит, рассеянный склероз, синдром Гийена - Барре, тяжелая миастения, боковой амиотрофический склероз, саркоидоз, гломерулонефрит, хроническое заболевание почек, цистит, псориаз (вкл. псориатический артрит), гнойный гидраденит, панникулит, гангренозную приодермию, SAPHO синдром (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остит), акне, синдром Свита, пемфигус, болезнь Крона (вкл. внекишечные проявления), язвенный колит, бронхиальная астма, гиперчувствительный пневмонит, общие аллергические реакции, аллергический ринит, аллергический синусит, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), фиброз лёгких, гранулематоз Вегенера, синдром Кавасаки, гигантоклеточный артериит, синдром Черджа–Стросс, нодозный полиартериит, ожоги, болезнь «трансплантат против хозяина», реакции «трансплантат против хозяина», кризы отторжения после трансплантации органа или костного мозга, системные и местные состояния васкулита в целом, системную и кожную красную волчанку, полимиозит и дерматомиозит, склеродермию, преэклампсию, острый и хронический панкреатит, вирусный гепатит, алкогольный гепатит, постхирургическое воспаление, такое как после офтальмологической операции (например, катаракты (замена хрусталика глаза) или хирургической операции в связи с глаукомой), хирургии суставов (вкл. артроскопическую хирургию), хирургии на структурах, связанных с суставом (например, связках), оральной и/или дентальной хирургии, малоинвазивных сердечно-сосудистых процедур

(например, РТСА, атерэктомии, установки стента), лапароскопических и/или эндоскопических интраабдоминальных и гинекологических процедур, эндоскопических урологических процедур (например, хирургии предстательной железы, уретероскопии, цистоскопии, интерстициального цистита), или

5 периоперационное воспаление (предотвращение) в целом, буллезный дерматит, нейтрофильный дерматит, токсический некроз эпидермиса, пустулёзный дерматит, церебральная форма малярии, гемолитический уремический синдром, отторжение аллотрансплантата, средний отит, укус ядовитой змеи, узловатая эритема, миелодиспластические синдромы, первичный склерозирующий

10 холангит, серонегативная спондилоартропатия, аутоиммунную гемолитическую анемию, ротолицевой гранулематоз, вегетирующий гнойный стоматит, афтозный стоматит, эксфолиативный глоссит, мигрирующий стоматит, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, паралич Белла, болезнь Крейцфельда-Якоба и дегенеративные заболевания нервной системы в

15 целом.

Остеолиз, связанный со злокачественным новообразованием, воспаление, связанное со злокачественным новообразованием, боль, связанная со злокачественным новообразованием, кахексия, связанная со злокачественным новообразованием, метастазы в кости, острые и хронические формы боли,

20 независимо от того, вызываются ли они центральными или периферическими эффектами $\text{TNF}\alpha$ и независимо от того, классифицируются ли они как воспалительные, ноцицептивные или невропатические формы боли, ишиалгия, боль в пояснично-крестцовой области, синдром карпального канала, симпатическая рефлекторная дистрофия (CRPS), подагра, постгерпетическая

25 невралгия, фибромиалгия, местные болевые состояния, хронические болевые синдромы вследствие метастатической опухоли, дисменорея.

Предпочтительные нарушения, подвергаемые лечению, включают состояния артрита в целом, ревматоидный артрит, остеоартрит, реактивный артрит, ювенильный артрит; псориаз, включая псориатический артрит;

30 воспалительное заболевание кишечника, включая болезнь Крона, язвенный колит, включая проктит, сигмоидит, проктосигмоидит, левосторонний колит, тотальный колит и панколит, неопределенный колит, микроскопический колит, включая коллагенозный и лимфоцитарный колит, колит при заболевании

соединительной ткани, воспаление в отключённой кишке, колит при дивертикулярной болезни, эозинофильный колит и резервуарный илеит.

Наиболее предпочтительно, антитело согласно изобретению используют для лечения воспалительного заболевания кишечника, в особенности, болезни Крона, язвенного колита или микроскопического колита. Болезнь Крона может представлять собой подвздошную, толстокишечную, тонкотолстокишечную или выделенную верхнюю болезнь Крона (желудочную, дуоденальную и/или тощекишечную), включая не-стриктурирующее/не-пенетрирующее, стриктурирующее, пенетрирующее и перианальное поведение заболевания, предоставляя возможность любой комбинации локализации и поведения заболевания любых из вышеуказанных. Язвенный колит может представлять собой язвенный проктит, проктосигмоидит, левосторонний колит, пан-язвенный колит и резервуарный илеит.

Комбинированная терапия и другие аспекты

Предпочтительно, пациент, подвергаемый лечению с применением вышеуказанного антитела к TNF α , также подвергается лечению с применением другого общепринятого лекарственного средства. Например, пациент, страдающий от воспалительного заболевания кишечника, в особенности, если он имеет от умеренного до тяжелого заболевания, типично также подвергается лечению с применением месалазина или его производных или пролекарств, кортикостероидов, например, будесонида или преднизолона (перорально или в/в), иммуносупрессантов, например, азатиоприна/6-меркаптопурина (6-MP) или метотрексата, циклоспорина или такролимуса. Другие лекарственные средства, которые можно совместно вводить пациенту, включают другие антитела к TNF α (например, инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб пегол, голимумаб), антагонисты интегрина (например, натализумаб, ведолизумаб), антитела к IL-23 (например, MEDI2070), антитела к β 7 (например, этролизумаб), JAK ингибиторы в JAK/STAT пути (например, тофацитиниб), и другие. Дальнейшие лекарственные средства, которые можно совместно вводить пациенту, включают иммуносупрессанты (например, азатиоприн/6-MP или метотрексат или пероральный циклоспорин) для поддержания стабильной и более длительной ремиссии. Еще другой аспект согласно изобретению представляет собой применение антитела к TNF α , как определено в настоящей заявке выше, для уменьшения воспаления.

Еще другой аспект согласно изобретению представляет собой антитело к TNF α , как определено в настоящей заявке выше для применения для уменьшения воспаления у пациента, страдающего от воспалительного заболевания.

5 Дальнейший аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения воспалительного заболевания, который включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к TNF α , как определено в настоящей заявке выше. Воспалительное заболевание предпочтительно представляет собой одно из состояний, описанных выше.

10 Дальнейший аспект настоящего изобретения представляет собой способ предотвращения воспалительного заболевания, который включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к TNF α , как определено в настоящей заявке выше. Воспалительное заболевание предпочтительно представляет собой одно из состояний, описанных выше.

15 Еще другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ улучшения транскитоza антитела, направленного на TNF α , включающий интродуцирование замен E380A и N434A в аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы получить модифицированное антитело, имеющее улучшенные транскитоз. Модифицированное антитело предпочтительно
20 представляет собой антитело, как описано в настоящей заявке выше.

Еще другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ увеличения периода полужизни в плазме антитела, направленного на TNF α , включающий интродуцирование замен E380A и N434A в аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы получить
25 модифицированное антитело, имеющее удлиненные период полужизни в плазме. Модифицированное антитело предпочтительно представляет собой антитело, как описано в настоящей заявке выше. Период полужизни в плазме может быть увеличен по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на
30 50%, относительно периода полужизни в плазме немодифицированного антитела (то есть, исходного антитела, в котором отсутствуют замены E380A и N434A).

Таблица 1. Обзор последовательностей перечня последовательностей.

SEQ ID NO:	Описание аминокислотной последовательности
1	Легкая цепь Ab-wt, исходное антитело модифицированных антител, используемых в примерах
2	Тяжелая цепь Ab-wt, исходное антитело модифицированных антител, используемых в примерах
3	CDR L1 клона 16-22-H05
4	CDR L2 клона 16-22-H05
5	CDR L3 клона 16-22-H05
6	CDR H1 клона 16-22-H05
7	CDR H2 клона 16-22-H05
8	CDR H3 клона 16-22-H05
9	V _H гуманизированного IgG клона 16-22-H05
10	V _L гуманизированного IgG клона 16-22-H05
11	Тяжелая цепь Ab-AA (на основании клона 16-22-H05)
12	Тяжелая цепь Ab-AA (на основании клона 17-22-B03)
13	Fc область Ab-AA (включая шарнирную область)
14	CDR L1 клона 17-22-B03
15	CDR L2 клона 17-22-B03
16	CDR L3 клона 17-22-B03
17	CDR H1 клона 17-22-B03
18	CDR H2 клона 17-22-B03
19	CDR H3 клона 17-22-B03
20	V _H гуманизированного IgG клона 17-22-B03
21	V _L гуманизированного IgG клона 17-22-B03 (sc08)
22	V _L гуманизированного IgG клона 17-22-B03 (sc02)
23	Легкая цепь гуманизированного IgG клона 17-22-B03 (sc08)
24	Легкая цепь гуманизированного IgG клона 17-22-B03 (sc02)

Примеры

5 Варианты антител

Создавали несколько вариантов антител к TNF α путем интродуцирования замен аминокислотную последовательность Fc области антитела. Мутации интродуцировали путем сайт-направленного мутагенеза с помощью хорошо известных методов. Вкратце, мутации интродуцировали путем ПЦР. Создавали прямой праймер, который содержит предназначенную мутацию, в то время как обратный создавали таким образом, чтобы 5' концы двух праймеров отжигали «спина-к-спине» (но не перекрывались) (Фигура 8). ПЦР прогоняли в течение 25 циклов (98°C в течение 10 с, 64°C в течение 30 с, 72°C в течение 3 минут). Перед прогоном ПЦР продукта на агарозном геле, немутированную ПЦР матрицу удаляли из объединенных ПЦР продуктов, используя рестрикционный фермент DpnI. После выделения ПЦР продукта из геля, тупые концы лигировали для

получения циркуляризованной плазмиды, которой трансформировали иммунокомпетентные клетки *E.coli*. После инкубирования в течение ночи, собирали несколько колоний, плазмидную ДНК выделяли и секвенировали для подтверждения того, что мутация была инкорпорирована.

5 Не-фукозилированные варианты генерировали путем добавления 0,15 мМ субстрата ловушки 2-дезоксид-2-фтор-2-фукоза в культуральную среду (Dekkers и др. (2016) *Sci Rep* 6:36964). Это приводило к существенно уменьшенной инкорпорации фукозы в IgG-Fc гликан, как показано в Пример 10 далее в настоящей заявке.

10 Таблица 2: Созданные варианты антител для антитела к TNF α (EU номенклатура)

Обозначение	Мутации по сравнению с исходным антителом
Ab-wt*	Нет (=исходное антитело)
Ab-AA**	E380A/N434A
Ab-AA-2FF**	не-фукозилированный вариант Ab-AA

* антитело не в соответствии с изобретением;

**антитело в соответствии с изобретением

15

Пример 1. Аффинность к TNF α

Метод:

Аффинность к TNF α измеряли с помощью Biacore. CM5 чип приготавливали, используя стандартные процедуры Biacore иммобилизации амина. После инсерции чипа CM5 систему праймировали и затем нормировали с помощью BIA-нормирующего раствора (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Чип добавляли в систему с PBS-T подвижным буфером; перед иммобилизацией поверхность чипа праймировали с помощью трех инъекций 50 мМ NaOH. Белок А иммобилизовали на поверхности чипа. Для этого, белок разводили до концентрации 5 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере при pH 4,5 и инъецировали таким образом, чтобы создать связанный ответ ~1000 RE во всех 4 проточных кюветах. Для удаления нековалентно связанного материала из всех проточных кювет с чипом, осуществляли три 15-ти секундные промывки с 50 мМ NaOH. На чипе Белок А, антитело захватывали в проточных кюветах 2 и 4, а проточные кюветы 1 и 3 использовали для вычитания эталона. Исследуемые антитела

разводили в PBS-T до 10 нМ и инъецировали 2,5-7,5 мкл для получения 120 PE захваченного антитела. Анализируемый TNF α приготавливали при концентрации 500 мкг/мл в воде, как указано поставщиком, и дополнительно разводили в подвижном буфере забуференный фосфатом физиологический раствор Твин-20 (PBS-T). Кинетики одного цикла использовали для оценки аффинности в стационарном состоянии. Для каждого анализа одного цикла, цикл титрации 5 концентраций аналита инъецировали над лигандом и после этого определяли диссоциацию комплекса. Поверхность регенерировали, используя глицин pH 1,7. Применяли метод двойных сравнений, в котором от данных поверхности захвата связанного лиганда (пк 2 и 4) вычитали сравнительные поверхности, в которых не было захвачено лиганда (пк 1 и 3 соответственно). Холостые инъекции буфера прогоняли каждые 3-4 цикла и затем вычитали циклы инъекции аналита, для коррекции небольших изменений для поверхности захвата лиганда. Повторные инъекции аналита в начале и после окончания каждого аналитического прогона использовали для проверки разложения образца, или изменения характеристик прибора. Все анализы осуществляли при 25°C и штатив для проб инкубировали при 10°C во время экспериментальных прогонов. Каждый эксперимент прогоняли по меньшей мере три раза. Модель связывания 1-к-1 связывание использовали для подгонки полученных кинетических данных.

Результаты:

Все антитела проявляли сходные кинетики связывания с TNF α , указывая на то, что любая интродуцированная модификация не приводит к существенным изменениям в антигенсвязывающем участке.

Таблица 3: Кинетики связывания вариантов IgG1 человека с TNF α , как определено с помощью SPR

	k_a ($10^6/\text{Mc}$)	k_d ($10^{-5}/\text{c}$)	K_D (нМ)
Ab-wt	$8,37 \pm 0,11$	$3,45 \pm 0,20$	$4,13 \pm 0,19$
Ab-AA	$8,54 \pm 1,55$	$2,06 \pm 0,19$	$2,47 \pm 0,67$
Ab-AA-2FF	$7,55 \pm 0,38$	$5,84 \pm 0,86$	$7,73 \pm 1,03$

Пример 2. Эффективность

Метод:

L929 клетки инкубировали с 0,25 нг/мл TNF α и 1 мкг/лунку актиномицина D в присутствии серийных разведений вариантов антител к TNF α . После инкубирования в течение 20 часов при 37°C/5% CO₂, измеряли пролиферативные

ответы, используя MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий и реагент связывания электронов (феназин этосульфат, PES). MTS превращался в формазановый продукт с помощью ферментов дегидрогеназ, которые присутствуют в

5 метаболически активных клетках. Количество формазанового продукта, что измеряли с помощью абсорбции при 492 нм, прямо пропорционально количеству живых клеток в культуре.

Результаты:

Результаты представлены на Фигуре 1. Интродукция мутаций в Fc область

10 антитела к TNF α не влияет на эффективность.

Пример 3. Аффинность к Fc γ рецепторам (CD64, CD32a, CD32b, CD16a, CD16b)

Метод:

Аффинность к Fc γ Rs измеряли с помощью Biacore. CM5 чип

15 приготавливали, используя стандартные процедуры Biacore иммобилизации амина. После инсерции чипа CM5 систему праймировали и затем нормировали с помощью BIA-нормирующего раствора (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Чип добавляли в систему с PBS-T подвижным буфером; перед иммобилизацией поверхность чипа праймировали с помощью трех инъекций 50 mM NaOH. Fc γ R

20 иммобилизовали на поверхности чипа, используя His-метки. Чип к гистидиновой метке приготавливали в соответствии с инструкцией набора Biacore, с ~12000 PE антитела, отложенного во всех 4 проточных кюветах. Для удаления нековалентно связанного материала из всех проточных кювет с чипом, осуществляли три 30-ти секундные промывки с 10 mM глицином pH 1,5. Fc γ

25 рецепторы разводили в PBS-T до диапазона 0,5-2 мкг/мл, с 2,5-5,0 мкл, инъецированных на чип, создавая уровни захвата между 60 и 200 PE. Антитела разводили в PBS-T перед анализом. Кинетики одного цикла использовали для оценки аффинности в стационарном состоянии. Для каждого анализа одного цикла, цикл титрации 5 концентраций антитела инъецировали над Fc γ R

30 лигандом и после этого определяли диссоциацию комплекса. Поверхность регенерировали, используя рекомендованный раствор, 10 mM глицин pH 1,5 для анти-His поверхности захвата. Применяли метод двойных сравнений, в котором от данных поверхности захвата связанного лиганда (пк 2 и 4) вычитали сравнительные поверхности, в которых не было захвачено лиганда (пк 1 и 3

соответственно). Холостые инъекции буфера прогоняли для каждого цикла титрования антитела и затем вычитали циклы инъекции аналита, для коррекции небольших изменений для поверхности захвата лиганда. Все анализы осуществляли при 25°C и штатив для проб инкубировали при 10°C во время экспериментальных прогонов. Каждый эксперимент прогоняли по меньшей мере три раза.

Результаты:

Связывание с CD64 не изменяется для сконструированных антител к TNF α . Интродукция мутаций не оказывает влияние на аффинность к CD32a(H), CD32a(R) и CD32b. Тем не менее, антитело Ab-AA-2FF продемонстрировало повышенную в 4,7 раз аффинность к CD16a(V). В особенности, нефукозилированное антитело Ab-AA-2FF также имело улучшенное связывание с CD16a рецептором с низкой аффинностью и с CD16b.

Таблица 4: Аффинность к Fc γ рецепторам CD64, CD32a(H), CD32a(R) и CD32b, как определено с помощью SPR. Представлены средняя аффинность и стандартное отклонение, рассчитанные на основании двух или более независимых экспериментов.

	Аффинность (K_D)			
	CD64 (нМ)	CD32a(H) (мкМ)	CD32a(R) (мкМ)	CD32b (мкМ)
Ab-wt	2,92 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,04	но	3,14 $\pm$ 0,80
Ab-AA	3,59 $\pm$ 0,21	1,41 $\pm$ 0,11	2,05 $\pm$ 0,02	2,17 $\pm$ 0,16
Ab-AA-2FF	3,17 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,24	1,56 $\pm$ 0,22	1,37 $\pm$ 0,22

Таблица 5: Аффинность к Fc γ рецепторам CD16a(V), CD16a(F) и CD16b, как определено с помощью SPR. Представлены средняя аффинность и стандартное отклонение, рассчитанные на основании двух или более независимых экспериментов.

	Аффинность (K_D)		
	CD16a(V) (нМ)	CD16a(F) (мкМ)	CD16b(NA2) (мкМ)
Ab-wt	184 $\pm$ 31,9	но	> 3,00
Ab-AA	707 $\pm$ 65,0	1,76 $\pm$ 0,33	2,24 $\pm$ 0,33
Ab-AA-2FF	39,4 $\pm$ 1,38	0,17 $\pm$ 0,002	0,47 $\pm$ 0,09

Пример 4. Аффинность к FcRn

Метод:

Осуществляли SPR, используя прибор Biacore 3000 с CM5 сенсорными чипами, связанными к IgG1 антителами к TNF α (~500 резонансные единицы (РК)), используя химию связывания амина, как описано производителем. Связывание осуществляли путем инъектирования 2,0 мкг/мл каждого белка в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, используя набор для связывания амина (GE Healthcare). Использовали HBS-P буфер pH 7,4 (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,005% поверхностно-активное вещество P20) или фосфатный буфер pH 6,0 (67 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, 0,005% Твин 20) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Определяли кинетики связывания путем инъектирования титруемых количеств (1000 – 31,2 нМ) мономерного His-меченного FcRn человека (hFcRn) над иммобилизованными антителами при pH 7,4 или pH 6,0. Все SPR эксперименты осуществляли при 25°C со скоростью потока 40 мкл/мин. Данные связывания скорректировали к нулю, и вычитали значение эталонной кюветы. Использовали модель связывания лиганда Ленгмюра 1:1, предоставленную программным обеспечением BIAevaluation (версия 4.1), для определения кинетик связывания.

Результаты:

Результаты свидетельствуют о том, что антитело дикого типа Ab-wt связывается жестко зависимо от pH с hFcRn. Сконструированные варианты антител имеют более высокую аффинность к FcRn при pH 6,0, но поддерживают их pH зависимость и не связываются с рецептором при pH 7,4. Все варианты антител продемонстрировали улучшенное связывание с FcRn по сравнению с инфликсимабом, который содержит Fc область IgG1 дикого типа.

Таблица 6: Аффинность вариантов антител к TNF α к FcR η при pH 6,0 и pH 7,4, как определено с помощью SPR

	pH 6,0			pH 7,4
	K _D (нМ)	Кратность изменения по сравнению с дт	Кратность изменения отн. IFX	K _D (нМ)
Ab-wt	1000			НО
Ab-AA	119	8,4	3,6	НО
Ab-AA-2FF	103	9,7	4,1	НО
IFX	425			НО

НО: не обнаруживается вследствие слабого связывания.

5

Пример 5. Трансцитоз

Метод:

Фильтры трансвел (1,12 см²) с покрытыми коллагеном политетрафторэтиленовыми (PTFE) мембранами с размером пор 0,4 мкм инкубировали О/Н в полной ростовой среде с последующим высеванием 1,0 x 10⁶ Т84 клеток на лунку. Трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER) мониторили ежедневно, используя MILLICELL-ERS-2 вольтметр. Культуры выращивали в течение 4 – 5 дней перед достижением конfluence с TEER значением ~1000 – 1300 Ω x см². Перед экспериментами монослой истощали в течение 1 ч в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS). После этого, 400 нМ вариантов антител или IFX отдельно или совместно с 4000 нМ IgG миеломы человека с нерелевантной специфичностью добавляли к апикальной камере трансвел. Образцы собирали из базолатерального резервуара через 0 и 4 ч после добавления. Концентрации антитела в базолатеральном резервуаре определяли с помощью ELISA. Вкратце, планшеты Maxisorp на 96-лунок покрывали в течение ночи либо с помощью рекомбинантного TNF α или античеловеческого Fc специфичного козьего антитела, оба компонента разводили до концентрации 1 мкг/мл в PBS. После этого, планшеты блокировали с помощью PBS, содержащего 4% обезжиренного молока в течение 2 часов при КТ, затем промывали 4 раза с помощью PBS, содержащего 0,05% Твин 20. Образцы, собранные во время экспериментов по трансцитозу, добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при КТ, перед промыванием, как описаны

15

20

25

выше. Определяли захваченные варианты антител, IFX или общий IgG, используя конъюгированное со щелочной фосфатазой (ALP) античеловеческое Fc специфическое козье антитело. Связывание визуализировали путем добавления 100 мкл ALP-субстрата и записывали спектр абсорбции при 405 нм.

- 5 Рассчитывали количество транспортированных вариантов антител, IFX и общего IgG, на основании стандартных кривых для каждого из индивидуальных вариантов антител.

Трансцитоз вариантов антител через поляризованные эпителиальные клетки человека

10 Результаты:

- Сконструированные варианты антител к TNF α тестировали для определения трансцитоза через монослой клеток и сравнивали с IFX в качестве другого IgG1 антитела человека к TNF α . Результаты представлены на Фигуре 2. По сравнению с IFX, IgG1 антителом з Fc областью дикого типа, Ab-AA
- 15 транспортируется более эффективно в 1,8 раза. Существенное увеличение, сходное с транспортом Ab-AA, также наблюдается для не-фукозилированной версии, Ab-AA-2FF.

Трансцитоз вариантов антител через поляризованные эпителиальные клетки человека в присутствии конкурирующего IgG

20 Результаты:

- Общее количество иммуноглобулина, транспортированного через поляризованный T84 клеточный монослой из апикального в базолатеральный резервуар, если варианты антител к TNF α инкубировали с 10-кратным избытком IgG миеломы человека через 4 часа после добавления, были сопоставимыми для
- 25 всех антител. Тем не менее, увеличенная аффинность к FcRn при pH 6,0 приводила к значительно более высокому процентному значению специфичного анти-TNF α транспорта через клеточный монослой также в присутствии избытка конкурирующего IgG человека с нерелевантной специфичностью. Результаты представлены на Фигуре 3.

30 **Пример 6. ADCC**

Метод:

Использовали набор «ADCC reporter bioassay core» от Promega. Вкратце, mTNF α CHO-K1 целевые клетки в концентрации 1×10^5 /мл высевали в белые (с прозрачным дном) планшеты для культивирования тканей, 100 мкл на лунку.

Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. В день 2, 95 мкл среды для количественного определения удаляли и заменяли на 25 мкл сконструированных Jurkat эффекторных клеток при 3×10^6 /мл. После этого планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C/5% CO₂. BioGlo™ реагент приготавливали к окончанию инкубирования. Планшеты уравнивали до КТ в течение 10 – 20 минут перед добавлением 75 мкл BioGlo™ реагента на лунку. После инкубирования в течение 5 – 10 минут в темноте, измеряли люминесценцию. Для подгонки данных использовали 4-PL модель.

Результаты:

Результаты (см. Фигуру 4) свидетельствуют о том, что все антитела к TNFα индуцируют ADCC, но с разной эффективностью. По сравнению с антителом дикого типа Ab-wt, Ab-AA проявляет сходную ADCC активность, в то время как не-фукозилированный вариант антитела Ab-AA-2FF имеет существенно улучшенную ADCC.

Пример 7. C1q связывание

Метод:

Осуществляли ELISA, используя планшеты MaxiSorp на 96 лунок, в которых лунки покрывали с применением TNFα человека, разведенного до концентрации 1 мкг/мл в PBS. После инкубирования в течение ночи при 4°C, планшеты блокировали с помощью PBS, содержащего 4% обезжиренное молоко в течение 1 часа и промывали четыре раза с применением PBS, содержащего 0,05% Твин-20 (PBS-T). После этого добавляли титруемые количества анти - TNFα IgG антитела, разведенные в PBS-T, и инкубировали в течение 1 часа при КТ. После промывания с использованием PBS-T, C1q человека (0,5 мкг/мл) разводили в 0,1 М буфере Veronal (0,25 mM CaCl₂ и 0,8 mM MgCl₂ pH 7,2), добавляли к лункам и инкубировали в течение 1 ч. После этого, лунки промывали, как описано выше, затем в лунки добавляли кроличий античеловеческий C1q, разведенный 1:5000 в PBS-T, и инкубировали в течение 1 часа. После промывки, добавляли HRP-конъюгированный антикроличий ослиный IgG, разведенный 1:5000 в PBS-T. После этого, лунки промывали и в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Абсорбцию измеряли при 620 нм, используя спектрофотометр Sunrise.

Результаты:

Варианты антител к TNF α захватывались на TNF α человека перед добавлением C1q человека. Результаты (см. Фигуру 5) свидетельствуют о том, что антитела связывают C1q но с разной эффективностью связывания. Иерархия связывания от наиболее сильной до самой слабой является следующей:

Ab-AA = IFX > Ab-AA-2FF.

Пример 8. Индукция регуляторных макрофаговМетод:

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из здоровых лейкоцитарных пленок. Клетки изолировали с помощью центрифугирования в градиенте фикола. Клетки двух индивидуальных доноров смешивали в равных количествах и 2×10^5 клеток смеси помещали в планшеты на 96 лунок в общей объеме 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C/5% CO₂. Через 48 ч, варианты антител к TNF α или IFX добавляли для достижения конечной концентрации 10 мкг/мл. Каждое соединение добавляли в пяти или шести повторах. Конечный объем составлял 150 мкл/лунку. IgG1 сыворотки человека (Sigma № I5154) использовали в качестве контроля. После добавления соединений, реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR) культивировали дополнительно в течение 4 дней при 37°C/5% CO₂. После этого, планшеты промывали с использованием PBS/5 mM EDTA (PBS/EDTA) и инкубировали с 50 мкл/лунку PBS/ EDTA в течение 20 минут при КТ. Планшеты центрифугировали и жидкость сливали. Антитело разводили в PBS/EDTA (анти-CD14-PE, анти -CD206-APC, оба разводили 1:10). Клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора антитела и инкубировали в течение 20 минут при КТ. После этого, клетки промывали с помощью PBS/EDTA и ресуспендировали в 50 мкл PBS/EDTA. Окрашенные образцы анализировали на FACS Fortessa, используя FACSDiva программное обеспечение. Анализ осуществляли, используя FlowJo программное обеспечение.

Результаты:

Индукцию регуляторных макрофагов анализировали на четырех независимых MLR и она была успешной во всех экспериментах (сравнение IFX с контрольным IgG). Результаты представлены на Фигуре 6. Уровни индукции с применением IFX могут отличаться между экспериментами в связи с тем, что каждый эксперимент осуществляли с применением различных доноров с

межиндивидуальной вариабельностью. Все тестированные варианты антител к TNF α индуцировали CD14⁺CD206⁺ регуляторные макрофаги с незначительным отклонением между соединениями. Ab-AA-2FF индуцировали значительно больше регуляторных макрофагов по сравнению с IFX.

5 **Пример 9. Ингибирование пролиферации Т-клеток**

Метод:

РВМС выделяли из здоровых лейкоцитарных пленок. Клетки изолировали с помощью центрифугирования в градиенте фиколла. Клетки двух индивидуальных доноров смешивали в равных количествах и 2 x 10⁵ клеток смеси помещали в планшеты на 96 лунок в общей объеме 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C/5% CO₂. Через 48 ч, варианты антител к TNF α или IFX добавляли для достижения конечной концентрации 10 мкг/мл. Каждое соединение добавляли в пяти или шести повторах. Конечный объем составлял 150 мкл/лунку. IgG1 сыворотки человека (Sigma № I5154) 10 использовали в качестве контроля. После добавления соединений, реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR) культивировали дополнительно в течение 2 дней при 37°C/5% CO₂. После этого к культурам добавляли меченный тритием тимидин (³H тимидин, 0,5 микрокюри/лунку). Культуры дополнительно инкубировали в течение 18 часов при 37°C/5% CO₂. Образцы собирали, 15 используя коллектор клеток Microbeta Filtermat 96 и анализировали, используя Microbeta MicroplateCounter, оборудованный единичным детектором. Образцы подчитывали в течение 10 секунд/лунку и превращали в число отсчетов в минуту (число импульсов в минуту).

Результаты:

25 Ингибирование пролиферации Т-клеток измеряли в трех независимых MLR и определяли как успешную, если IFX в качестве положительного контроля индуцировал супрессию. Уровень супрессии с помощью IFX в индивидуальных экспериментах может отличаться, предположительно, вследствие колебаний индукции регуляторных макрофагов. В каждом эксперименте, рассчитывали 30 потенциальные возможности вариантов антител к TNF α подавлять пролиферацию Т-клеток по отношению к положительному контролю IFX. Антитело Ab-AA-2FF продемонстрировало существенно увеличенную супрессию по сравнению с IFX, в то время как Ab-AA продемонстрировало

значительно меньшую супрессию пролиферации Т-клеток по сравнению с IFX (см. Фигуру 7).

Пример 10. Анализ N-гликанов

Метод:

5 50 мкл каждого варианта IgG (1 мг/мл) центрифугировали в течение 10 минут при 13000×g, затем добавляли 1 мкг трипсина, растворенного в 100 мкл 50 мМ бикарбоната аммония (pH 7,8) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Центрифужные аппараты центрифугировали при 13000×g в течение 10 минут, и с непрерывным потоком переносили в пробирку Эппендорфа и высушивали в 10 SpeedVac (Heto Maxi сушка). Обезвоженные образцы растворяли в 20 мкл 1% муравьиной кислоты, обрабатывали ультразвуком в течение 30 с, и центрифугировали в течение 10 минут при 16100×g. После этого, каждый образец переносили в новые флаконы, и осуществляли нано-онлайн жидкостную хроматографию с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) с обращенной 15 фазой (C18) протеолитических пептидов, используя Dionex Ultimate 3000 UHPLC системы (Thermo Fisher Scientific, USA). 5 мкл раствора пептида инъецировали в экстракционную колонку и пептиды элюировали в режиме промывки противотоком из экстракционной колонки на аналитическую колонку. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды масс-спектрометрической 20 степени чистоты, оба компонента содержали 0,1 % муравьиной кислоты. Осуществляли хроматографическое разделение, используя бинарный градиент от 3 до 50 % ацетонитрила в воде в течение 60 минут со скоростью потока 0,3 мкл/мин. ЭХ система была спарена с источником ионов наноэлектрораспыления с фотоэлектронным умножителем масс-спектрометром «Q exactive hybrid quadrupole orbitrap» (Thermo Fisher Scientific, USA). Образцы пептидов 25 анализировали с помощью метода фрагментации высокоэнергетической столкновительной диссоциации HCD (HCD) с нормированной энергией столкновений при 20, осуществляя одно Orbitrap исследуемое сканирование в массовом диапазоне m/z 300-2000 с последующей МС/МС десяти наиболее 30 интенсивных ионов на Orbitrap.

Анализ данных осуществляли на Xcalibur v2.0. МС/МС спектры для всех N-глико-пептидов рассчитывали путем поиска иона оксония; 204086 (N-ацетилгексозамин) и 3661388 (N-ацетилгексозамин-гексоза). Путем применения HCD фрагментации с нормированной энергией столкновений при 20 определяли

структуру гликанов и массу пептидов для IgG. Экстрагированные ионные хроматограммы для целевых гликоль-пептидов (EEQYNSTYR для IgG1) вычисляли с точностью 10 част. на млн и соответствующие спектры МС/МС верифицировали вручную. HCD фрагментацию с нормированной энергией столкновений при 35 использовали для определения последовательности пептида и для верификации, что масса пептида соответствует правильной пептидной последовательности. Рассчитывали площадь под кривой для всех экстрагированных гликоль-пептидов и определяли процентное соотношение для каждой гликоформы.

Результаты:

Для Ab-AA доминировали две формы N-гликанов и они соответствовали > 90% общего N-гликанового пула, а именно 4GlcNac-1Fuc-3Man и 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal. Обе доминирующие формы N-гликанов содержали ядерную фукозу. Для получения “не-фукозилированной” версии Ab-AA (Ab-AA-2FF), использовали ловушки субстрата 2-дезоксид-2-фтор-1-фукоза (2FF). При МС картировании этого антитела подтверждали, что эта стратегия успешно приводила к существенно уменьшенной инкорпорации фукозы, поскольку обнаружили снижение с > 90% до < 10%. Доминирующие формы N-гликанов после обработки были такими же, как и у вариантов при отсутствии 2FF, за исключением того, что в этих структурах отсутствовала фукоза (см. также Фигуру 9).

Таблица 7: Процентные соотношения форм N-гликанов, присоединенных к N297 IgG антител к TNF α

Структура N-гликана	Ab-AA (%)	Ab-AA-2FF (%)
4GlcNac-1Fuc-3Man	70,2	7,1
4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal	24,2	2,8
4GlcNac-3Man	0	67,3
4GlcNac-3Man-1Gal	0	16,5
Другие профили гликозилирования	5,6	6,3

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее TNF α -связывающий домен и FcRn-связывающий сайт, имеющее высокую аффинность к FcRn человека при pH 6, указанная высокая аффинность характеризуется константой равновесия при диссоциации (K_D) меньше чем 500 нМ, и которое дополнительно не имеет аффинности или имеет низкую аффинность к FcRn человека при pH 7,4, указанная низкая аффинность характеризуется K_D больше чем 10 мкМ, где аминокислотная последовательность антитела содержит аминокислоты 380А и 434А.
2. Антитело по пункту 1, где аминокислотная последовательность антитела дополнительно содержит аминокислоту 307Т.
3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, имеющее аффинность к FcRn человека при pH 6, которая является больше, чем такая аффинность инфликсимаба.
4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная высокая аффинность к FcRn человека характеризуется константой диссоциации K_D меньше чем 300 нМ.
5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с TNF α человека с K_D меньше чем 100 пМ.
6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону в бóльшем количестве по сравнению с инфликсимабом.
7. Антитело по пункту 6, где количество антитела, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, в два раза превышает количество исходного иммуноглобулина, транспортируемого через поляризованный клеточный монослой, где указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что он содержит аминокислоты 380Е и 434N.

8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где бóльшее количество в процентах антитела по сравнению с инфликсимабом транспортируется через поляризованный клеточный монослой из апикальной стороны на базолатеральную сторону в присутствии десятикратного избытка конкурирующих иммуноглобулинов, где количество в процентах относится к общей массе иммуноглобулинов, транспортируемых через поляризованный клеточный монослой.

9. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой не-фукозилированное антитело.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предыдущих пунктов.

11. Антитело по любому из пунктов 1 - 9 для применения для лечения воспалительного заболевания.

12. Антитело для применения по пункту 11, где воспалительное заболевание представляет собой воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта.

13. Антитело для применения по пункту 11, где указанное лечение включает пероральное введение эффективного количества указанного антитела.

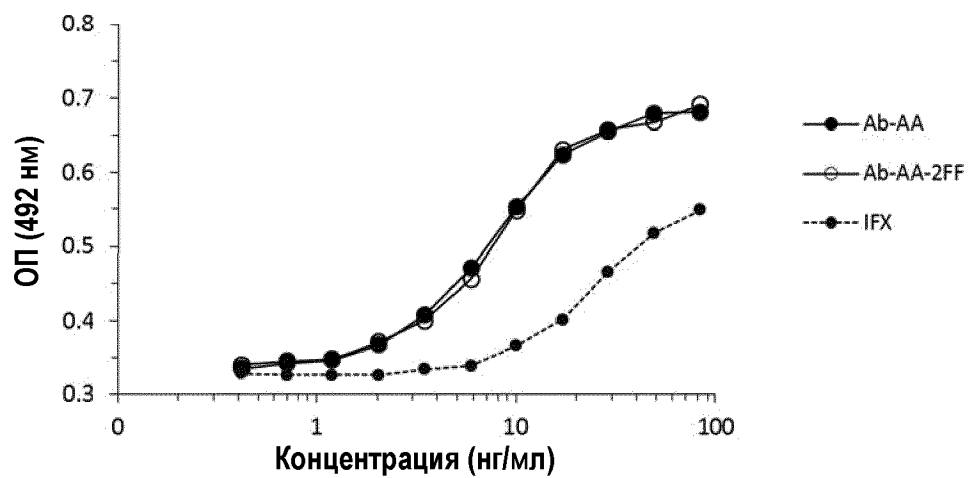
14. Антитело для применения по пункту 11 или 12, где указанное антитело применяют местно.

15. Фармацевтическая композиция, которая содержит антитело по любому из пунктов 1 - 9.

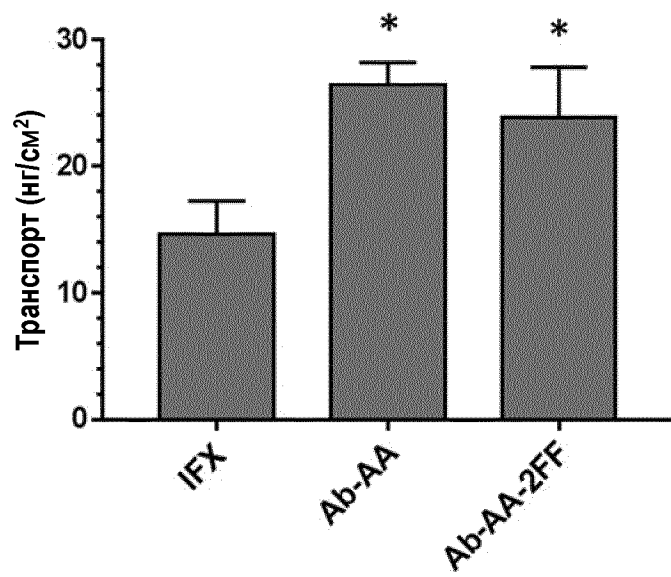
16. Способ улучшения транскитоza антитела, направленного на TNF α , включающий интродуцирование замен E380A и N434A в аминокислотной последовательности антитела.

17. Способ увеличения времени полужизни в плазме антитела, направленного на $\text{TNF}\alpha$, включающий интродуцирование замен E380A и N434A в аминокислотной последовательности антитела.

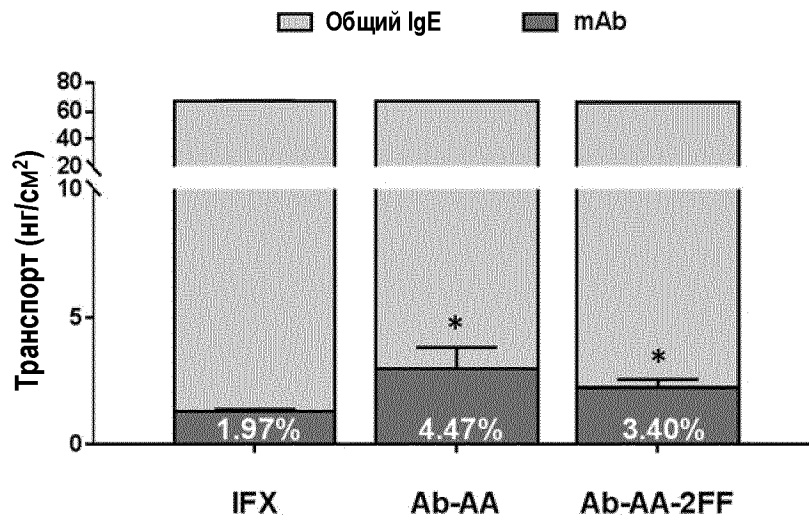
Фигура 1



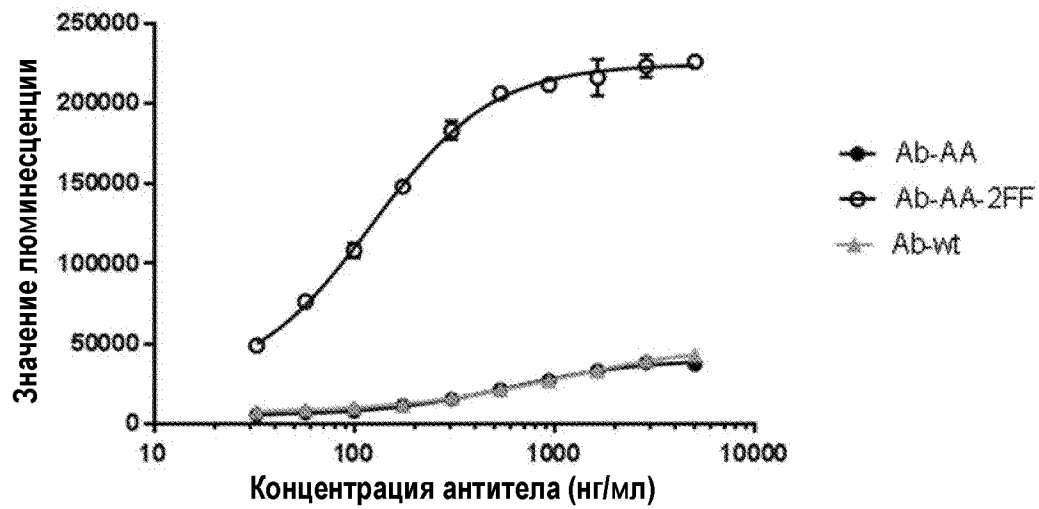
Фигура 2



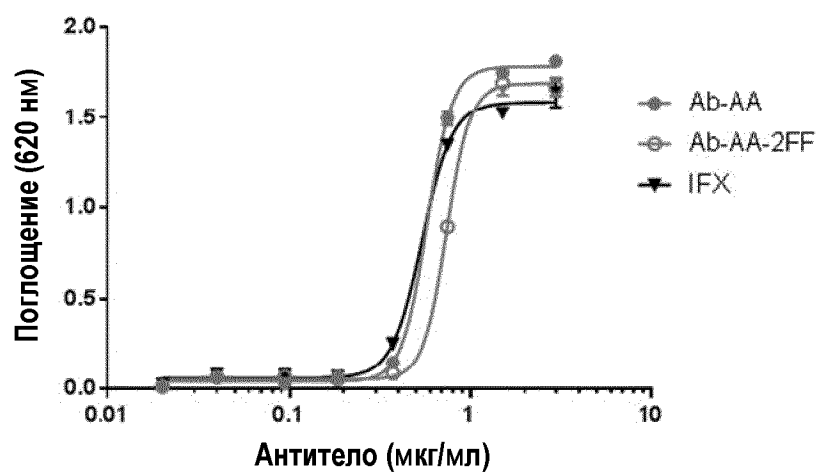
Фигура 3



Фигура 4

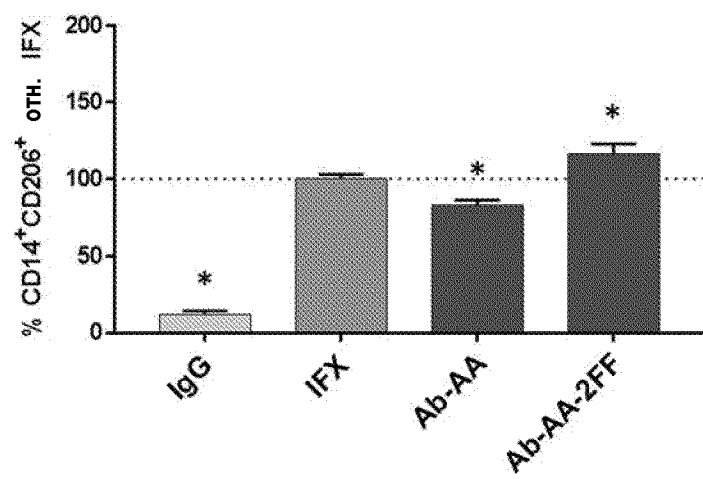


Фигура 5

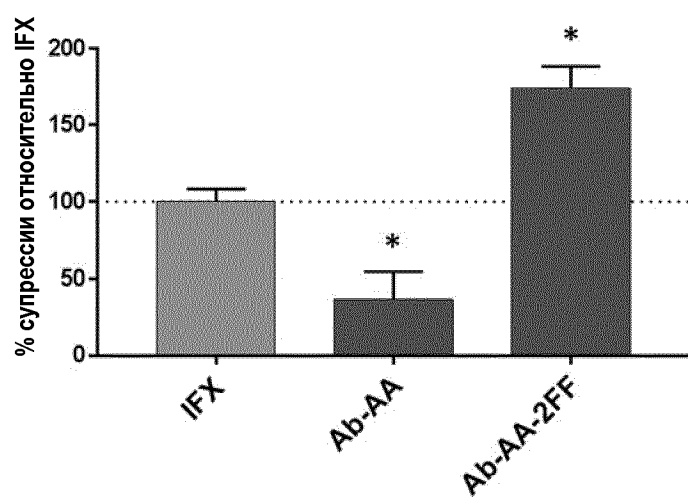


Фигура 6

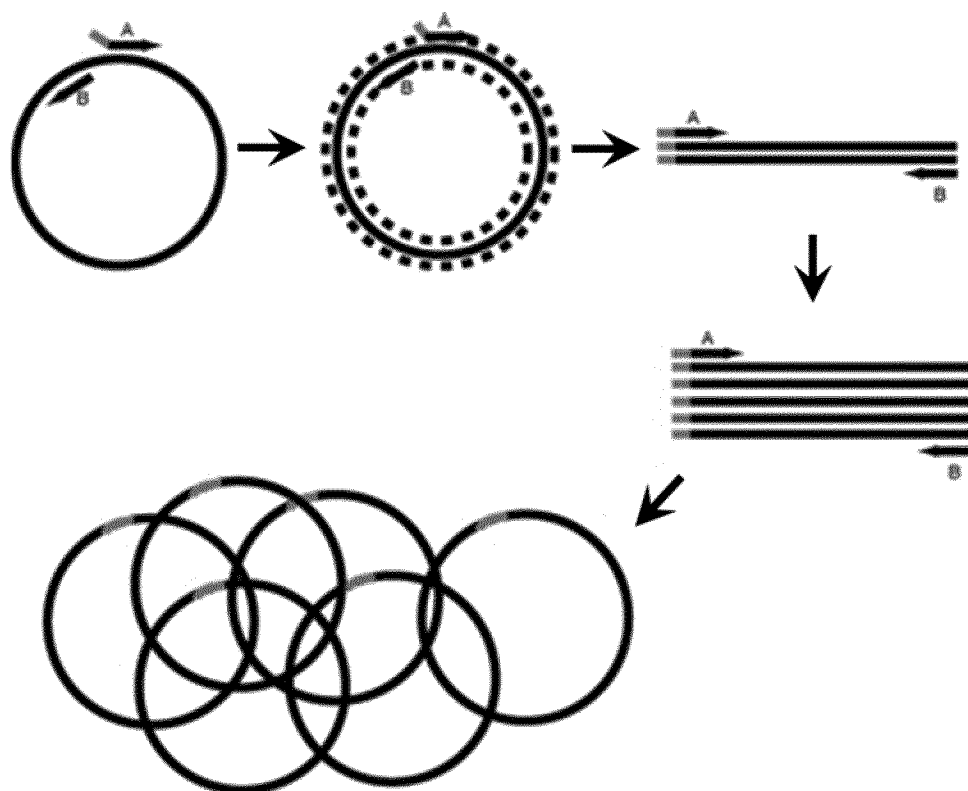
5



Фигура 7



Фигура 8



Фигура 9

