

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090872** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.07.30

(51) Int. Cl. *C07K 16/12* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.09.27

**(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ АНТИГЕН-МИШЕНЬ STAPHYLOCOCCUS И КОМПОНЕНТ КОМПЛЕМЕНТА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/565,569; 62/654,576

(32) 2017.09.29; 2018.04.09

(33) US

(86) PCT/US2018/053064

(87) WO 2019/067682 2019.04.04

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Прасад Бринда, Мерфи Эндрю, Мигер  
Каролина, Мэйсон Питер (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает компонент комплемента. В конкретных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию являются способными связывать антиген-мишень из вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее, и/или являются способными стимулировать накопление комплемента на поверхности вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ. Антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения заболеваний, при которых ингибирование или уменьшение роста вида *Staphylococcus* является желательным и/или терапевтически предпочтительным, например, для лечения стафилококковых инфекций, включая кожную инфекцию, целлюлит, пневмонию, менингит, инфекцию мочевыводящих путей, синдром токсического шока, эндокардит, остеомиелит, бактериемию или сепсис, или для предотвращения или лечения стафилококковой инфекции, возникающей в результате хирургической процедуры.

**A1**

**202090872**

**202090872**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561545EA/032

### **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ АНТИГЕН-МИШЕНЬ STAPHYLOCOCCUS И КОМПОНЕНТ КОМПЛЕМЕНТА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

[0001] Эта заявка подана 27 сентября 2018 г. как Международная патентная заявка РСТ, и по ней испрашивается приоритет Предварительных Патентных заявок США No. 62/565569, поданной 29 сентября 2017 г.; и 62/654576, поданной 9 апреля 2018 г., полное содержание каждой из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

[0002] Настоящее изобретение относится к биспецифической антигенсвязывающей молекуле, которая связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus* и компонент комплемента, и к их применениям.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Инфекции человека *Staphylococcus*, особенно устойчивым к метициллину *Staphylococcus aureus*, приближаются к статусу эпидемии. В 2005 г., инфекции *Staphylococcus aureus* имели показатель смертности 6,3 на 100000 человек в США. В результате, проводили значительные исследования по разработке вакцины. Способы вакцинации были нацелены на капсульные полисахариды, белок утилизации железа *IsdB*, фактор агглютинации *a* и липотейхоевую кислоту. (Daum et al, Clin Inf. Dis. 54:560 (2012)). Однако, эти вакцины не были очень эффективными в клинических исследованиях, что позволяет предполагать, что способы вакцинации могут требовать комбинации множества антигенов и/или стимуляции иммунного ответа.

[0004] *Staphylococcus* имеет способность избегать иммунного ответа. Одним аспектом иммунного ответа хозяина на стафилококковую инфекцию является продукция антител, опсонизирующих поверхность клетки и приводящих к опосредованному компонентом лизису и/или фагоцитозу. Капсульные полисахариды видов *Staphylococcus* защищают против фагоцитоза. Также, белок *A* поверхности клетки секвестрирует антитела посредством связывания с фрагментом *Fc* антител, ингибируя фагоцитоз. Некоторые виды продуцируют молекулы, ингибирующие функцию комплемента и опосредованный компонентом лизис. Эти свойства делают проблематичным лечение инфекций *Staphylococcus*, особенно если организм является устойчивым к антибиотикам. Таким образом, существует необходимость в более эффективных лекарственных средствах, которые могут ингибировать стафилококковые инфекции.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0005] В соответствии с первым аспектом, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен (D1), который связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*; и второй антигенсвязывающий домен (D2), который связывает компонент комплемента. Классические компоненты комплемента включают C1q, C1r, C1s, C2, C3,

C4, C5, C6, C7, C8, C9 или любые их фрагменты (включая протеолитические фрагменты, образованные посредством каскада реакций комплемента). В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее. В следующих вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула стимулирует накопление компонента комплемента на поверхности вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, компонент комплемента представляет собой C1q. В других вариантах осуществления, C1q представляет собой C1q человека. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* представляет собой *Staphylococcus aureus* или *Staphylococcus epidermidis*. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень из вида *Staphylococcus* включает капсульный полисахарид типа 5, капсульный полисахарид типа 8, IsdB, IsdA, IsdH, липотейхоевую кислоту, тейхоевую кислоту клеточной стенки, липазу, липазу V8, фермент модификации жирных кислот, компоненты поверхности микроорганизмов, узнающие адгезивные молекулы матрикса (например, адгезины, связывающие фибриноген молекулы, связывающий фибронектин белок А, связывающий фибронектин белок В), фактор агглютинации А (clfA), поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень из вида *Staphylococcus* представляет собой регулируемый железом белок с поверхностной детерминантой В (IsdB).

**[0006]** В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, биспецифические антигенсвязывающие молекулы связывают антиген-мишень из вида *Staphylococcus* регулируемый железом белок с поверхностной детерминантой В (IsdB) и C1q человека; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также обозначены в настоящем описании как «биспецифические молекулы против IsdB x против C1q». Антигенсвязывающий домен против IsdB из биспецифической молекулы против IsdB x против C1q можно использовать для нацеливания на микроорганизмы, экспрессирующие IsdB (например, *Staphylococcus aureus*), и антигенсвязывающий домен против C1q из биспецифической молекулы можно использовать для стимуляции накопления C1q на поверхности вида *Staphylococcus*. Одновременное связывание антигенсвязывающих молекул с антигеном-мишенью, таким как IsdB, на микроорганизме и с C1q человека способствует направленному уничтожению (лизису клеток) микроорганизма-мишени. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы против IsdB x против C1q по настоящему изобретению, таким образом, можно использовать, среди прочего, для лечения заболеваний и нарушений, связанных с или вызванных микроорганизмами (например, инфекции, сепсиса и т.п.).

**[0007]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, содержат первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывает IsdB, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывает C1q человека. Настоящее изобретение относится к

биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q (например, биспецифическим антителам), где каждый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) в паре с вариабельной областью легкой цепи (LCVR). В конкретных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения, каждый из антигенсвязывающего домена против C1q (D2) и антигенсвязывающего домена против IsdB (D1) содержит отличные, отдельные HCVR в паре с такой же или отличной LCVR. Например, как проиллюстрировано в примере 3 в настоящем описании, сконструированы биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, происходящую из антитела против IsdB; и второй антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, происходящую из антитела против C1q. В иллюстративных молекулах, описанных в настоящем описании, образование пары HCVR из антитела против IsdB с LCVR, имеющей последовательности, описанные в настоящем описании в таблице 3, образует антигенсвязывающий домен, который специфически связывает IsdB (но не связывает C1q). В иллюстративных молекулах, описанных в настоящем описании, образование пары HCVR из антитела против C1q с LCVR, имеющей последовательности, описанные в настоящем описании в таблице 1, образует антигенсвязывающий домен, который специфически связывает C1q (но не связывает IsdB).

**[0008]** Антигенсвязывающая молекула, как используют в контексте настоящего описания, включает полипептиды, которые связывают конкретный антиген (например, молекулу-мишень [Т] или ее часть) с  $K_D$  менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно 90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40 пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно 0,1 пМ, или менее, чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

**[0009]** Антигенсвязывающий домен включает полипептиды, которые связывают антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, такой как IsdB, (например, молекулу-мишень [Т] или ее часть) с  $K_D$  менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно

90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40 пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно 0,1 пМ, или менее, чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

**[0010]** Антигенсвязывающий домен включает полипептиды, которые связывают компонент комплемента, такой как C1q, с  $K_D$  менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно 90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40 пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно 0,1 пМ, или менее, чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

**[0011]** Настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает IsdB, связывает IsdB, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 3-574 из SEQ ID NO:169. Виды *Staphylococcus* могут иметь различные аминокислотные последовательности IsdB. Такие аминокислотные последовательности можно легко получать.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен D1 содержит CDR вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащиеся внутри HCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID. NO: 138 или аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 154; и CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащиеся внутри области LCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID. NO:146 или аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:162. Первый антигенсвязывающий домен D1 содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, как указано в таблице 3 или таблице 6. Первый антигенсвязывающий домен D1 может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, как указано в таблице 3 или таблице 6. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, первый антигенсвязывающий домен D1 содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ

ID NO:138/146 или SEQ ID NO: 154/162. Настоящее изобретение относится также к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где первый антигенсвязывающий домен D1 содержит любые аминокислотные последовательности CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, как указано в таблице 3 или таблице 6, и/или любые аминокислотные последовательности CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в таблице 3 или таблице 6.

**[0013]** В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где первый антигенсвязывающий домен D1 содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:154 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0014]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где первый антигенсвязывающий домен D1 содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:162 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0015]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где первый антигенсвязывающий домен D1 содержит CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:160 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:168 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности. В конкретных вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен D1 содержит пару HCDR3/LCDR3, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:144/152, 144/168, 160/152 или 160/168.

**[0016]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, где первый антигенсвязывающий домен D1 содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:156 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:158 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по

меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:160 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен D1 содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:164 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:166 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:168 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0017]** Конкретные неограничивающие, иллюстративные биспецифические антигенсвязывающие молекулы против IsdB x против C1q по настоящему изобретению включают первый антигенсвязывающий домен D1, содержащий набор CDR HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, где набор CDR HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:140, 142, 144, 148, 150, 152; 140, 142, 144, 164, 166, 168; 156, 158, 160, 148, 150, 152; или 156, 158, 160, 164, 166, 168.

**[0018]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, где второй антигенсвязывающий домен D2, который специфически связывает C1q, связывает C1q человека, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:171 и SEQ ID NO:172. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgG1-k человека с IC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее. В других вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgM человека с IC<sub>50</sub> приблизительно 50 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула обеспечивает накопление C1q с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления, второй антигенсвязывающий домен D2 содержит CDR HCVR, содержащиеся внутри HCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 114, 122, 130 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0020]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где второй антигенсвязывающий домен D2 содержит CDR LCVR содержащиеся внутри LCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:162 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0021]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где второй антигенсвязывающий домен D2 содержит пару HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2/146, 10/146, 90/146, 98/146, 106/146, 66/162, 74/162, 82/162, 18/162, 26/162, 34/162, 42/162, 50/162, 58/162, 114/162, 122/162 или 130/162.

**[0022]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим молекулам против IsdB x против C1q, где второй антигенсвязывающий домен D2 содержит CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128, 136 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO:168 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0023]** В конкретных вариантах осуществления, второй антигенсвязывающий домен D2 содержит пару HCDR3/LCDR3, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:8/152, 8/168, 16/152, 16/168, 24/152, 24/168, 32/152, 32/168, 40/152, 40/168, 48/152, 48/168, 56/152, 56/168, 64/152, 64/168, 72/152, 72/168, 80/152, 80/168, 88/152, 88/168, 96/152, 96/168, 104/152, 104/168, 112/152, 112/168, 120/152, 120/168, 128/152, 128/168, 136/152 или 136/168.

**[0024]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, где второй антигенсвязывающий домен D2 содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 100, 108, 116, 124 или 132, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 102, 110, 118, 126 или 134, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 тяжелой



цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128 или 136. В некоторых вариантах осуществления, второй антигенсвязывающий домен D2 содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:164 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:166 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:168 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0025]** Конкретные неограничивающие, иллюстративные биспецифические антигенсвязывающие молекулы против IsdB x против C1q по настоящему изобретению содержат второй антигенсвязывающий домен D2 содержащий набор CDR HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, где набор CDR HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 4, 6, 8, 148, 150, 152; 12, 14, 16, 148, 150, 152; 92, 94, 96, 148, 150, 152; 100, 102, 104, 148, 150, 152; 108, 110, 112, 148, 150, 152; 20, 22, 24, 148, 150, 152; 28, 30, 32, 148, 150, 152; 36, 38, 40, 148, 150, 152; 44, 46, 48, 148, 150, 152; 52, 54, 56, 148, 150, 152; 60, 62, 64, 148, 150, 152; 68, 70, 72, 148, 150, 152; 76, 78, 80, 148, 150, 152; 84, 86, 88, 148, 150, 152; 116, 118, 120, 148, 150, 152; 124, 126, 128, 148, 150, 152; 132, 134, 136, 148, 150, 152; 4, 6, 8, 164, 166, 168; 12, 14, 16, 164, 166, 168; 92, 94, 96, 164, 166, 168; 100, 102, 104, 164, 166, 168; 108, 110, 112, 164, 166, 168; 20, 22, 24, 164, 166, 168; 28, 30, 32, 164, 166, 168; 36, 38, 40, 164, 166, 168; 44, 46, 48, 164, 166, 168; 52, 54, 56, 164, 166, 168; 60, 62, 64, 164, 166, 168; 68, 70, 72, 164, 166, 168; 76, 78, 80, 164, 166, 168; 84, 86, 88, 164, 166, 168; 116, 118, 120, 164, 166, 168; 124, 126, 128, 164, 166, 168; или 132, 134, 136, 164, 166, 168.

**[0026]** В родственном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, где второй антигенсвязывающий домен D2 содержит CDR тяжелой и легкой цепи, содержащиеся внутри пары последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), где пара HCVR/LCVR содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2/146, 10/146, 90/146, 98/146, 106/146, 66/162, 74/162, 82/162, 18/162, 26/162, 34/162, 42/162, 50/162, 58/162, 114/162, 122/162 или 130/162.

**[0027]** В некоторых вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен D1, который содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 140, 142, 144, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную

последовательность из SEQ ID NO: 148, 150, 152; и второй антигенсвязывающий домен D2, который содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4, 6, 8, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 148, 150, 152. В других вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен D1, который содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 140, 142, 144, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 148, 150, 152; и второй антигенсвязывающий домен D2, который содержит CDR HCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 108, 110, 112, и CDR LCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 148, 150, 152. В следующих вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 138/146, или SEQ ID NO: 154/162; и второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2/146, 10/146, 90/146, 98/146, 106/146, 66/162, 74/162, 82/162, 18/162, 26/162, 34/162, 42/162, 50/162, 58/162, 114/162, 122/162 или 130/162.

**[0028]** В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR из биспецифических антигенсвязывающих молекул против IsdB x против C1q, описанных в настоящем описании, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, как указано в таблицах 2 и 4 в настоящем описании, так же как молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие две или более из полинуклеотидных последовательностей, как указано в таблицах 2 и 4 в любой их функциональной комбинации или аранжировке. Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным экспрессирующим векторам, несущим нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, и к клеткам-хозяевам, в которые введены такие векторы, так же как к способам получения антител посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продукцию антител, и выделения полученных антител.

**[0029]** Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, где любые из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают C1q, скомбинированы, связаны или иным образом ассоциированы с любыми из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают IsdB, для формирования биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая связывает C1q и IsdB. Антигенсвязывающие домены можно комбинировать рядом различных способов, включая использование одноцепочечных Fv, перенацеливаемых белков с двойной аффинностью, tandemных диател, образования пар выступа и впадины,

образования пар по заряду, перекрестных Mab, Ig с двойными вариабельными доменами, s-Fab и Fv-Fc, как описано в настоящем описании.

**[0030]** Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых применениях, можно использовать модификацию для удаления нежелательных участков гликозилирования, или антитело, лишенное группы фукозы, присутствующей в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, можно осуществлять модификацию галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (например, добавление концевой галактозы усиливает ADCC).

**[0031]** В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу против IsdB х против C1q, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, представляющей собой комбинацию биспецифической антигенсвязывающей молекулы против IsdB х против C1q и второго лекарственного средства. В одном варианте осуществления, второе лекарственное средство представляет собой любое средство, которое преимущественным образом комбинируют с биспецифической антигенсвязывающей молекулой против IsdB х против C1q. Иллюстративные средства, которые можно преимущественным образом комбинировать с биспецифической антигенсвязывающей молекулой против IsdB х против C1q, включают антибиотик, антитело, которое связывает антиген *Staphylococcus*, антитело, которое связывает токсин *Staphylococcus*, антитело, которое связывает C1q человека или яванского макака, вакцину, специфическую для вида *Staphylococcus*, и конъюгат антитела с лекарственным средством (например, биспецифическое антитело в комбинации с антибиотиком).

**[0032]** В другом аспекте, настоящее изобретение относится к терапевтическим способам ингибирования роста видов *Staphylococcus* у субъекта, включающим введение выделенной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, как описано в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, субъекту. В некоторых вариантах осуществления, способ представляет собой способ лечения инфекции видом *Staphylococcus* у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ предназначен для лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, вызванные видом *Staphylococcus*, где заболевание или нарушение представляет собой кожную инфекцию, целлюлит, пневмонию, менингит, инфекцию мочевыводящих путей, синдром токсического шока, эндокардит, перикардит, остеомиелит, бактериемию или сепсис. В некоторых вариантах осуществления, способ предназначен для лечения субъекта, которого подвергали, или которого планируют подвергать хирургической процедуре, где субъект подвержен риску получения инфекции *Staphylococcus*. В некоторых вариантах осуществления, хирургическая процедура

включает имплантацию протеза, включая протез конечности, такой как рука или нога, или замена тазобедренного сустава. В некоторых вариантах осуществления, протез представляет собой косметический протез, включая глазной протез, силиконовые кисти рук, пальцы рук, пальцы ног, молочные железы или лицевой имплантат.

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления, способ представляет собой способ нацеливания на клетки/уничтожения клеток *Staphylococcus*, экспрессирующих антиген-мишень, такой как IsdB, с использованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы против IsdB x против C1q по настоящему изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу против IsdB/против C1q по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту.

**[0034]** Настоящее изобретение относится также к применению биспецифической антигенсвязывающей молекулы против IsdB x против C1q по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, связанного с или вызванного *Staphylococcus*.

**[0035]** Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора следующего подробного описания.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

**[0036]** Перед раскрытием настоящего описания, следует понимать, что это изобретение не является ограниченным описанными конкретными способами и условиями эксперимента, поскольку такие способы и условия могут меняться. Следует понимать также, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

**[0037]** Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, какое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится это изобретение. В рамках изобретения, термин «приблизительно», при использовании в отношении конкретного перечисленного числового значения, означает, что это значение может отклоняться от перечисленного числового значения не более, чем на 1%. Например, в рамках изобретения, выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

**[0038]** Несмотря на то, что способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем описании, можно использовать в практике или тестировании настоящего изобретения, в настоящее время описаны предпочтительные способы и материалы.

## **Определения**

**[0039]** В рамках изобретения, «антитело, которое связывает компонент комплемента» или «антитело против компонента комплемента» включает антитела и их

антигенсвязывающие фрагменты, специфически узнающие компонент комплемента. В одном варианте осуществления, антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению связывают компонент комплемента C1q. Иллюстративный белок C1q имеет аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:171 и SEQ ID NO:172.

**[0040]** В рамках изобретения, выражение «антитело, которое связывает компонент комплемента», «антитело против компонента комплемента» или «антитело против C1q» включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает IsdB, и второе плечо, которое связывает C1q, где плечо против C1q содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 или таблице 6 в настоящем описании. Примеры биспецифических антител против C1q описаны в другом месте настоящего описания.

**[0041]** Выражение «C1q», в рамках изобретения, относится к компоненту комплемента C1q, который является членом каскада реакций комплемента. Компонент комплемента C1q человека представляет собой гексамер, который содержит три уникальные субъединицы: А (29 кДа); В (26 кДа); и С (22 кДа). Иллюстративная последовательность субъединицы А обнаружена в аминокислотах 1-245 из номера доступа NP\_057075 и показана в SEQ ID NO:170. Иллюстративная последовательность субъединицы В обнаружена в аминокислотах 1-253 из номера доступа NP\_000482 и показана в SEQ ID NO:171. Иллюстративная последовательность субъединицы С обнаружена в аминокислотах 1-245 из номера доступа NP\_758957 и показана в SEQ ID NO:172. В некоторых вариантах осуществления, C1q представляет собой C1q человека.

**[0042]** В рамках изобретения, «антитело, которое связывает C1q», или «антитело против C1q» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически узнают отдельную субъединицу C1q (например, компонент А, В или С), так же как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически узнают мультимер, такой как тример или гексамер. C1q включает природные белки C1q, так же как рекомбинантный белок C1q, или их варианты.

**[0043]** В рамках изобретения, выражение «антитело, которое связывает C1q» или «антитело против C1q» включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, и второе плечо, которое связывает C1q, где плечо против C1q содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 или таблице 6 в настоящем описании. Примеры биспецифических антител против C1q описаны в другом месте настоящего описания.

**[0044]** В рамках изобретения, выражение «антигенсвязывающая молекула» обозначает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий из по меньшей мере одной определяющей комплементарность области (CDR), которая, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными CDR и/или

каркасными областями (FR), специфически связывает конкретный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающая молекула содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов. Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

**[0045]** Выражение «вид *Staphylococcus*», в рамках изобретения, относится к виду микроорганизма *Staphylococcus*. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* представляет собой вид, ассоциированный с инфекциями у человека, включая *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* и/или *Staphylococcus saprophiticus*.

**[0046]** В рамках изобретения, «антиген-мишень» относится к антигену, обнаруженному в виде или на поверхности вида *Staphylococcus*. Антигены-мишени включают антигены, обнаруженные на поверхности клетки вида *Staphylococcus*. Иллюстративные антигены-мишени включают капсульный полисахарид типа 5, капсульный полисахарид типа 8, IsdB, IsdA, IsdH, липотейхоевую кислоту, тейхоевую кислоту клеточной стенки, фактор агглютинации A (clfA), поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), липазу, липазу V8, фермент модификации жирных кислот, компоненты поверхности микроорганизмов, узнающие адгезивные молекулы матрикса (например, адгезины, связывающие фибриноген молекулы, связывающий фибронектин белок A, связывающий фибронектин белок B), или их комбинации.

**[0047]** В рамках изобретения, «антитело, которое связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*», или «антитело против мишени вида *Staphylococcus*» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически узнают антиген-мишень на поверхности клетки или у вида *Staphylococcus*. В одном варианте осуществления, антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению связывают антиген-мишень, обозначенный как «регулируемый железом поверхностный белок B» или «IsdB». иллюстративный белок IsdB имеет аминокислотную последовательность из аминокислот 3-574 из SEQ ID NO:169.

**[0048]** В рамках изобретения, выражение «антитело, которое связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*», «антитело против мишени вида *Staphylococcus*» или «антитело против IsdB» включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает IsdB, и второе плечо, которое связывает C1q, где плечо против IsdB содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 или таблице 6 в настоящем описании. Примеры биспецифических антител против IsdB описаны в другом месте настоящего описания. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело, содержащее одно плечо, которое связывает IsdB, и одно плечо, которое связывает C1q, содержит следующие полноразмерные аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 173 содержит полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) антитела, которое связывает C1q; SEQ ID NO: 174

содержит полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела, которое связывает IsdB; и SEQ ID NO: 175 содержит полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) биспецифического антитела, которое связывает IsdB и C1q. В одном варианте осуществления, антитело, имеющее эти полноразмерные последовательности, обозначено как H1H20631D.

**[0049]** Термин «антитело», в рамках изобретения, обозначает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, C1q). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, так же как их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (обозначенную в настоящем описании как HCVR или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (обозначенную в настоящем описании как LCVR или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен ( $C_{L1}$ ). Области  $V_H$  и  $V_L$  можно далее подразделять на области гипервариабельности, названные определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными, названными каркасными областями (FR). Каждый из  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, аранжированных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, FR антитела против C1q (или их антигенсвязывающая часть) могут являться идентичными человеческим зародышевым последовательностям, или могут являться естественным образом или искусственно модифицированными. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, FR антитела против IsdB (или их антигенсвязывающая часть) могут являться идентичными человеческим зародышевым последовательностям, или могут являться естественным образом или искусственно модифицированными. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определять на основании параллельного анализа двух или более CDR.

**[0050]** Термин «антитело», в рамках изобретения, включает также антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий домен» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, и т.п., в рамках изобретения, включают любой природный, поддающийся получению ферментным способом, синтетический или полученный способами генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с формированием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое

расщепление или рекомбинантные способы генной инженерии, включающих манипуляцию с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или является легко доступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляции химически или с использованием способов молекулярной биологии, например, для аранжировки одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, образования остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

**[0051]** В рамках изобретения, выражение «антигенсвязывающий домен» обозначает любой пептид, полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу каркасного типа, молекулу пептидного дисплея или содержащую полипептидную конструкцию, способную специфически связывать конкретный представляющий интерес антиген (например, компонент комплемента или антиген-мишень из вида *Staphylococcus*).

**[0052]** Термин «специфически связывает» или т.п., в рамках изобретения, означает, что антигенсвязывающий домен образует комплекс с конкретным антигеном, характеризующийся константой диссоциации ( $K_D$ ) 25 нМ или менее. Иллюстративные категории антигенсвязывающих доменов, которые можно использовать в контексте настоящего описания, включают антитела, антигенсвязывающие части антител, пептиды, специфически взаимодействующие с конкретным антигеном (например, пептидные антитела), молекулы рецепторов, специфически взаимодействующие с конкретным антигеном, белки, содержащие лигандсвязывающую часть рецептора, который специфически связывает конкретный антиген, антигенсвязывающие каркасы (например, дарпины, белки с повторами HEAT, белки с повторами ARM, белки с тетраатрикопептидными повторами, и другие каркасы на основе белков с природными повторами и т.д., [см., например, Boersma and Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857, и процитированные в этом документе ссылки]) и аптамеры или их части.

**[0053]** Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически друг с другом, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, и т.п.. Например, антигенсвязывающая молекула, как используют в контексте настоящего описания, включает полипептиды которые связывают конкретный антиген (например, молекулу-мишень [Т] или ее часть) с  $K_D$  менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно 90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40



пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно 0,1 пМ, или менее, чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

**[0054]** Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают : (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); фрагменты (vi) dAb; (vii) антигенсвязывающий домен и (viii) минимальные единицы узнавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с затрудненной конформацией. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с deletированным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, моновалентные наноантитела, двухвалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», в рамках изобретения.

**[0055]** Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и может, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, смежную или находящуюся в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V<sub>H</sub>, ассоциированный с доменом V<sub>L</sub>, домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть расположены друг относительно друга в любой пригодной аранжировке. Например, вариабельная область может являться димерной и содержать димеры V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>.

**[0056]** В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие, иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить внутри антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему описанию, включают: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены либо могут быть напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной, или

линкерной области. Шарнирная область может содержать или состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему описанию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

**[0057]** Как и полноразмерные молекулы антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела может, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен является способным к специфическому связыванию с отдельным антигеном или с отличным эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, описанные в настоящем описании, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему описанию с использованием общепринятых способов, доступных в данной области.

**[0058]** Антитела по настоящему описанию могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой опосредуемой клетками цитотоксичности (ADCC). «Комплементзависимая цитотоксичность» (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток посредством антитела по настоящему изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая опосредуемая клетками цитотоксичность» (ADCC) относится к опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcR) (например, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерять с использованием анализов, хорошо известных и доступных в данной области. (См., например, Патенты США No 5500362 и 5821337, и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656).

**[0059]** В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, антитела против C1q и/или против IsdB по настоящему изобретению (моноспецифические или биспецифические) представляют собой человеческие антитела. Термин «человеческое антитело», в рамках изобретения, предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные человеческими последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической

мутации *in vivo*), например, в CDR, и в частности, CDR3. Однако, термин «человеческое антитело», в рамках изобретения, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевых последовательностей других видов млекопитающих, таких как мышь, привиты в человеческие каркасные последовательности. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным способом у не относящегося к человеку млекопитающего или в клетках не относящегося к человеку млекопитающего. Термин не предназначен для включения антител, выделенных или полученных у субъекта-человека.

**[0060]** Антитела по настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Термин «рекомбинантное человеческое антитело», в рамках изобретения, предназначен для включения всех человеческих антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описанного далее ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанной далее ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенной по генам человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. В конкретных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  из рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, в то время как происходят из зародышевых последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  человека, и являются родственными им, могут не существовать в природе в пределах зародышевого репертуара человеческих антител *in vivo*.

**[0061]** Человеческие антитела могут существовать в двух формах, ассоциированных с гетерогенностью шарнира. В одной форме, молекула иммуноглобулина содержит стабильную конструкцию из четырех цепей приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе посредством дисульфидных связей между тяжелыми цепями. Во второй форме, димеры не являются связанными посредством межцепевых дисульфидных связей, и формируется молекула приблизительно 75-80 кДа, составленная из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Разделять эти формы было необычайно сложно, даже после аффинной очистки.

**[0062]** Частота встречаемости второй формы в разных интактных изотипах IgG обусловлена, но без ограничения, структурными различиями, ассоциированными с изотипом шарнирной области этого антитела. Замена одиночной аминокислоты в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшать появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение относится к антителам с одной или несколькими мутациями в шарнирной области, в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, которые могут являться желательными, например, в производстве, для улучшения выхода желательной формы антитела.

**[0063]** Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело», в рамках изобретения, обозначает антитело, идентифицированное и отделенное и/или выделенное по меньшей мере из одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, отделенное или удаленное по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело естественным образом существует или естественным образом продуцируется, представляет собой «выделенное антитело», для целей по настоящему описанию. Выделенное антитело включает также антитело *in situ* внутри рекомбинантной клетки. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые подвергали по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, выделенное антитело может являться в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

**[0064]** Настоящее изобретение относится также к одноплечевым антителам, которые связывают C1q или IsdB. В рамках изобретения, «одноплечевое антитело» обозначает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела по настоящему описанию могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 или таблице 3 в настоящем описании.

**[0065]** Нацеленные против C1q, против IsdB или биспецифические антигенсвязывающие молекулы, описанные в настоящем описании, могут содержать одну или несколько замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасной областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепи, по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых происходят антитела. Такие мутации можно легко определять посредством сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, с зародышевыми последовательностями, доступными, например, из публичных баз данных антител. Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, происходящим из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, где одна или несколько аминокислот внутри одной или нескольких каркасных областей и/или областей CDR подвергнуты мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) зародышевой

последовательности, из которой происходит антитело, или до соответствующего остатка(остатков) другой человеческой последовательности, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего зародышевого остатка(остатков) (такие изменения последовательности в совокупности обозначены в настоящем описании как «зародышевые мутации»). Специалист в данной области, начиная с последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепи, описанных в настоящем описании, может легко получать многочисленные антигенсвязывающие молекулы, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько индивидуальных зародышевых мутаций, или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления, все из остатков каркасной области и/или CDR внутри доменов  $V_H$  и/или  $V_L$  подвергают обратному мутагенезу до остатков, обнаруженных в исходной зародышевой последовательности, из которой происходит антитело. В других вариантах осуществления, только определенные остатки подвергают обратному мутагенезу до исходной зародышевой последовательности, например, только мутантные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот из FR1 или в пределах последних 8 аминокислот из FR4, или только мутантные остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или несколько из остатка(остатков) каркасной области и/или CDR подвергают мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) другой зародышевой последовательности (т.е., зародышевой последовательности, отличной от зародышевой последовательности, из которой исходно происходит антитело). Кроме того, антигенсвязывающие молекулы, антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему описанию могут содержать любую комбинацию из двух или более зародышевых мутаций внутри каркасных областей и/или областей CDR, например, где определенные индивидуальные остатки подвергают мутагенезу до соответствующего остатка конкретной зародышевой последовательности, в то время как определенные другие остатки, отличные от исходной зародышевой последовательности, сохраняют или подвергают мутагенезу до соответствующего остатка другой зародышевой последовательности. После получения, антигенсвязывающие молекулы, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько зародышевых мутаций, можно легко тестировать по одному или нескольким желательным свойствам, таким как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от случая), уменьшенная иммуногенность и т.д. Антигенсвязывающие молекулы, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение.

**[0066]** Настоящее изобретение относится также к нацеленным против C1q, против IsdB или биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к нацеленным против C1q, против IsdB или

биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в таблице 1 или таблице 3 в настоящем описании. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин, и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) содержащие серу боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любую замену, имеющую положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любую замену, имеющую неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

**[0067]** Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, взаимодействующей со специфическим антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут являться либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образован пространственно сближенными аминокислотами из различных фрагментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных условиях, эпитоп может включать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

**[0068]** Термин «значительная идентичность» или «по существу идентичный», применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, означает, что, при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью), присутствует идентичность нуклеотидной последовательности в по меньшей мере приблизительно 95%, и более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%

нуклеотидных оснований, как измерено посредством любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждают ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в конкретных случаях, кодировать полипептид, имеющий одинаковую или по существу сходную аминокислотную последовательность с полипептидом, кодированным эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

**[0069]** Применительно к полипептидам, термин «значительное сходство» или «по существу сходный» означает, что пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием стоимости пропусков по умолчанию, разделяют по меньшей мере 95% идентичность последовательности, даже более предпочтительно, по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентную идентичность последовательностей или степень сходства можно увеличивать для коррекции на консервативный характер замены. Способы этой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Сходство последовательностей для полипептидов, также обозначаемое как идентичность последовательности, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков устанавливает совпадения сходных последовательностей с использованием показателей сходства, приписанных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнивать с использованием FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программу GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

### **Антитела против компонентов комплемента или их антигенсвязывающие фрагменты**

**[0070]** В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение относится к антителам против компонентов комплемента. Компоненты комплемента включают C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или любые их фрагменты (включая протеолитические фрагменты, образованные посредством каскада реакций комплемента). В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают C1q (например, моноспецифическим антителам против C1q). В некоторых вариантах осуществления, C1q представляет собой C1q человека. C1q человека содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:171 и/или SEQ ID NO:172. Антитела, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, можно использовать, среди прочего, для нацеливания на C1q и активации комплемента против специфических мишеней. Антитела против C1q по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты можно включать в биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, направляющую опосредованную C1q активацию комплемента против специфических типов клеток-мишеней, таких как виды *Staphylococcus*.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления, отбирают антитела против C1q, которые ингибируют связывание C1q с молекулами иммуноглобулинов, ингибируют гемолиз и/или комплементзависимую цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgG1-к человека с  $IC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее. В других вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgM человека с  $IC_{50}$  приблизительно 50 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует комплементзависимую цитотоксичность с  $IC_{50}$  приблизительно 100 нМ или менее. В других вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула обеспечивает накопление C1q человека с  $EC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее. В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающая молекула по изобретению может не проявлять одного или нескольких из следующего: блокирования или ингибирования связывания IgG, или гемолиза, или комплементзависимой цитотоксичности, как описано в настоящем описании, но все еще может являться эффективной для предотвращения инфекции *Staphylococcus*, или для лечения существующей инфекции у субъекта.

**[0072]** Иллюстративные антитела против C1q по настоящему описанию перечислены в таблицах 1 и 2 в настоящем описании. В таблице 1 указаны идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), так же как определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных



антител против C1q. В таблице 2 указаны идентификаторы последовательности молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител против C1q.

**[0073]** Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR вариабельной области тяжелой цепи, содержащиеся внутри HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0074]** Настоящее изобретение относится также к антителам против C1q или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR вариабельной области легкой цепи, содержащиеся внутри LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0075]** Настоящее изобретение относится также к антителам против C1q или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против C1q, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, антитело против C1q содержит пару HCVR/LCVR, пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2/146 (например, H1xH17736P2); SEQ ID NO: 10/146 (например, H1xH17738P2), SEQ ID NO: 18/162 (например, H1xH17751P2), SEQ ID NO: 34/162 (например, H1xH17758P2), SEQ ID NO: 66/162 (например, H1xH17773P2), 90/146 (например, H1xH18392P2); 98/146 (например, H1xH18394P2); 106/146 (например, H1xH18395P2); 74/162 (например, H1xH17779P2); 82/162 (например, H1xH17781P2); 26/162 (например, H1xH17756P2); 42/162 (например, H1xH17760P2); 50/162 (например, H1xH17763P2); 58/162 (например, H1xH17769P2); 114/162 (например, H1xH18400P2); 122/162 (например, H1xH18411P2); или 130/162 (например, H1xH18412P2).

**[0076]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0077]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0078]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0079]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0080]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0081]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[0082]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим пару HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных

последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против C1q, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, пара HCDR3/LCDR3 содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 16/152 (например, H1xH17738P2), SEQ ID NO: 24/168 (например, H1xH17751P2), SEQ ID NO: 40/168 (например, H1xH17758P2), SEQ ID NO: 72/168 (например, H1xH17773P2), SEQ ID NO: 8/152 (например, H1xH17736P2); 96/152 (например, H1xH18392P2); 104/152 (например, H1xH18394P2); 112/152 (например, H1xH18395P2); 80/168 (например, H1xH17779P2); 88/168 (например, H1xH17781P2); 32/168 (например, H1xH17756P2); 48/168 (например, H1xH17760P2); 56/168 (например, H1xH17763P2); 64/168 (например, H1xH17769P2); 120/168 (например, H1xH18400P2); 128/168 (например, H1xH18411P2); или 136/168 (например, H1xH18412P2).

**[0083]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител против C1q, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, набор HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 4, 6, 8, 148, 150, 152 (например, H1xH17736P2); 92, 94, 96, 148, 150, 152 (например, H1xH18392P2); 100, 102, 104, 148, 150, 152 (например, H1xH18394P2); 108, 110, 112, 148, 150, 152 (например, H1xH18395P2); 76, 78, 80, 164, 166, 168 (например, H1xH17779P2); 84, 86, 88, 164, 166, 168 (например, H1xH17781P2); 28, 30, 32, 164, 166, 168 (например, H1xH17756P2); 44, 46, 48, 164, 166, 168 (например, H1xH17760P2); 52, 54, 56, 164, 166, 168 (например, H1xH17763P2); 60, 62, 64, 164, 166, 168 (например, H1xH17769P2); 116, 118, 120, 164, 166, 168 (например, H1xH18400P2); 124, 126, 128, 164, 166, 168 (например, H1xH18411P2); SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 150, 152 (например, H1xH17738P2), SEQ ID NO: 20, 22, 24, 164, 166, 168 (например, H1xH17751P2), SEQ ID NO: 36, 38, 40, 164, 166, 168 (например, H1xH17758P2), SEQ ID NO: 68, 70, 72, 164, 166, 168 (например, H1xH17773P2) или 132, 134, 136, 164, 166, 168 (например, H1xH18412P2).

**[0084]** В родственном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека, содержащим набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) содержащийся внутри пары HCVR/LCVR, как определено в любом из иллюстративных антител против C1q, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся внутри пары HCVR/LCVR, содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2/146

(например, H1xH17736P2); SEQ ID NO: 10/146 (например, H1xH17738P2), SEQ ID NO: 18/162 (например, H1xH17751P2), SEQ ID NO: 34/162 (например, H1xH17758P2), SEQ ID NO: 66/162 (например, H1xH17773P2), 90/146 (например, H1H20633D; 98/146 (например, H1xH18392P2); 106/146 (например, H1xH18395P2); 74/162 (например, H1xH17779P2); 82/162 (например, H1xH17781P2); 26/162 (например, H1xH17756P2); 42/162 (например, H1xH17760P2); 50/162 (например, H1xH17763P2); 58/162 (например, H1xH17769P2); 114/162 (например, H1xH18400P2); 122/162 (например, H1xH18411P2); или 130/162 (например, H1xH18412P2). Методы и способы для идентификации CDR внутри аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации CDR внутри указанных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, описанных в настоящем описании. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на изменчивости последовательности, определение Chothia основано на локализации областей структурных петель, и определение AbM является компромиссом между способами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Доступны также публичные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

**[0085]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против C1q или их фрагменты. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0086]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0087]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты

**[0089]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0090]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0091]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0092]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты

содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[0093]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, содержащую набор из трех CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено в любом из иллюстративных антител против C1q, перечисленных в таблице 1.

**[0094]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, содержащую набор из трех CDR (т.е., LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено в любом из иллюстративных антител против C1q, перечисленных в таблице 1.

**[0095]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней. В конкретных вариантах осуществления, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR обе происходят из одного и того же антитела против C1q из перечисленных в таблице 1.

**[0096]** Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий переменную область тяжелой или легкой цепи антитела против C1q. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, содержащим любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е., молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любые из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в таблице 1. В объем настоящего описания включены также клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, так же как способы получения антител или их фрагментов посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих

продукцию антител или фрагментов антител, и выделения антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

**[0097]** Настоящее изобретение относится к антителам против C1q, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления, модификацию для удаления нежелательных участков гликозилирования или антитело, лишенное группы фукозы, присутствующей на олигосахаридной цепи, можно использовать, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, можно осуществлять модификацию галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

#### **Антитела против антигена-мишени из вида *Staphylococcus* или их антигенсвязывающие фрагменты**

**[0098]** В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают антиген-мишень из вида *Staphylococcus* (например, к моноспецифическому антителу против антигена-мишени из вида *Staphylococcus*). В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* представляет собой вид, вызывающий инфекцию у человека. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* включает *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* и/или *Staphylococcus saprophiticus*. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень из вида *Staphylococcus* включает капсульный полисахарид типа 5, капсульный полисахарид типа 8, IsdB, IsdA, IsdH, липотейхоевую кислоту, тейхоевую кислоту клеточной стенки, фактор агглютинации A (clfA), поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), липазу, липазу V8, фермент модификации жирных кислот, компоненты поверхности микроорганизмов, узнающие адгезивные молекулы матрикса (например, адгезины, связывающие фибриноген молекулы, связывающий фибронектин белок A, связывающий фибронектин белок B), белок A или их комбинации.

**[0099]** В одном варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает IsdB. В одном варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающий IsdB, связывает IsdB, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 3-574 из SEQ ID NO:169. Антитела против IsdB по настоящему изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, можно включать в биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывает специфические типы клеток-мишеней, такие как инфекционные агенты. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает вид *Staphylococcus* с IC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее.

**[00100]** Иллюстративные антитела против IsdB по настоящему описанию перечислены в таблицах 3 и 4. В таблице 3 указаны идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), так же как определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей

легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против IsdB. В таблице 4 указаны идентификаторы последовательности молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител против IsdB.

**[00101]** Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащиеся внутри HCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID. NO: 138, аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 154 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащиеся внутри области LCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID. NO:146, аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:162 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00102]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против IsdB, перечисленных в таблице 3. В конкретных вариантах осуществления, пара HCVR/LCVR содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146 или SEQ ID NO: 154/162.

**[00103]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00104]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB человека, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.



**[00105]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00106]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 3, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00107]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 3, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00108]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00109]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим пару HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против IsdB, перечисленных в таблице 3. В конкретных вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает IsdB, содержит пару HCDR3/LCDR3, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:144/152, 144/168, 160/152 или 160/168.

**[00110]** Настоящее изобретение относится также к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:156 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:158 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:160 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает IsdB, содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:164 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:166 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:168 или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00111]** Конкретные неограничивающие, иллюстративные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают IsdB, содержат набор из шести CDR HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 140, 142, 144, 148, 150, 152; 140, 142, 144, 164, 166, 168; 156, 158, 160, 148, 150, 152; или 156, 158, 160, 164, 166, 168.

**[00112]** В другом аспекте, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые из последовательностей HCVR, LCVR или CDR антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают IsdB, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, как указано в таблице 4 в настоящем описании, так же как к молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим две или более из полинуклеотидных последовательностей, как указано в таблицах 2 и 4, в любой их функциональной комбинации или аранжировке. Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным экспрессирующим векторам, несущим нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, и к клеткам-хозяевам, в которые введены такие векторы, так же как к способам получения антител посредством

культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продукцию антител, и выделения полученных антител.

**[00113]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против IsdB или их фрагменты. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00114]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00115]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00116]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00117]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в таблице 4,

или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00118]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00119]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00120]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00121]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, содержащую набор из трех CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено в любом из иллюстративных антител против IsdB, перечисленных в таблице 3.

**[00122]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, содержащую набор из трех CDR (т.е., LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено в любом из иллюстративных антител против IsdB, перечисленных в таблице 3.

**[00123]** Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3. В

конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 4, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней. В конкретных вариантах осуществления, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR обе происходят из одного и того же антитела против IsdB из перечисленных в таблице 3.

**[00124]** Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий переменную область тяжелой или легкой цепи антитела против IsdB. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, содержащим любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е., молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любые из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в таблице 3. В объем настоящего описания включены также клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, так же как способы получения антител или их фрагментов посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продукцию антител или фрагментов антител, и выделения антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

**[00125]** Настоящее изобретение относится к антителам против IsdB, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления, модификацию для удаления нежелательных участков гликозилирования или антитела, лишённого группы фукозы, присутствующей на олигосахаридной цепи, можно использовать, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, можно осуществлять модификацию галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

#### **Биспецифические антигенсвязывающие молекулы**

**[00126]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (D1 и D2). Один антигенсвязывающий домен (D1) специфически связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, например, IsdB, и второй антигенсвязывающий домен (D2) связывает компонент комплемента, например, C1q.

**[00127]** В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus* (например, моноспецифическое антитело против антигена-мишени из вида *Staphylococcus*). В некоторых вариантах

осуществления, вид *Staphylococcus* представляет собой вид, вызывающий инфекцию у человека. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* включает *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* и/или *Staphylococcus saprophiticus*. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень из вида *Staphylococcus* содержит капсульный полисахарид типа 5, капсульный полисахарид типа 8, IsdB, IsdA, IsdH, липотейхоевую кислоту, тейхоевую кислоту клеточной стенки, фактор агглютинации A (clfA), поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), липазу, липазу V8, фермент модификации жирных кислот, компоненты поверхности микроорганизмов, узнающие адгезивные молекулы матрикса (например, адгезины, связывающие фибриноген молекулы, связывающий фибронектин белок A, связывающий фибронектин белок B), белок A или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления, антиген-мишень из вида *Staphylococcus* представляет собой IsdB.

**[00128]** В некоторых вариантах осуществления, второй антигенсвязывающий домен (D2) связывает любой из компонентов комплемента. Компоненты комплемента включают C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или любые их фрагменты (включая протеолитические фрагменты, полученные посредством каскада реакций комплемента). В конкретных вариантах осуществления, компонент комплемента представляет собой C1q. Комплемент активируется посредством серий протеолитических стадий, активируемых посредством трех главных путей: классического пути (CP), который, как правило, активируется посредством иммунных комплексов, альтернативного пути (AP), который может быть индуцирован незащищенными поверхностями клеток, и пути связывающего маннозу лектина (MBL). Классический путь инициируется связыванием C1q/r<sub>2</sub>/s<sub>2</sub> с областью Fc IgM и IgG или непосредственно с поверхностью патогена, приводящим к аутоактивации сериновой протеазы C1r, которая активирует сериновую протеазу C1s, которая, в свою очередь, расщепляет/активирует C2 и C4, что затем приводит к расщеплению C3 и C5, C5b объединяется с C6, C7, C8 и C9 для формирования мембраноатакующего комплекса (MAC), приводящего к лизису клеток.

**[00129]** Антигенсвязывающий домен включает полипептиды, которые связывают антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, такой как IsdB, (например, молекулу-мишень [T] или ее часть) с K<sub>D</sub> менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно 90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40 пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно



**[00131]** Термин «поверхностный плазмонный резонанс», в рамках изобретения, относится к оптическому феномену, позволяющему анализ взаимодействий в реальном времени посредством детекции изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

**[00132]** Термин « $K_D$ », в рамках изобретения, обозначает равновесную константу диссоциации конкретного белок-белкового взаимодействия (например, взаимодействия антитело-антиген). Если не указано иное, значения  $K_D$ , описанные в настоящем описании, относятся к значениям  $K_D$ , определенным посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C и/или при 37°C.

**[00133]** В то время как настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, где одно плечо иммуноглобулина связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus* (например, первый антигенсвязывающий домен, D1), и другое плечо иммуноглобулина является специфическим для компонента комплемента, такого как C1q (например, второй антигенсвязывающий домен, D2), антиген-мишень может представлять собой любой антиген, экспрессированный на поверхности вида или в виде *Staphylococcus*, направленный против которого иммунный ответ является желательным. В некоторых вариантах осуществления, компонент комплемента может включать C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или любые их фрагменты (включая протеолитические фрагменты, полученные посредством каскада реакций комплемента). В конкретных вариантах осуществления, компонент комплемента представляет собой C1q. Компоненты D1 и/или D2 биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию могут содержать или состоять из антигенсвязывающих фрагментов полноразмерных молекул антител.

**[00134]** В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию, где одно плечо антитела связывает C1q, и другое плечо связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, антиген-мишень может представлять собой антиген поверхности клетки. Неограничивающие примеры специфических антигенов-мишеней включают капсульный полисахарид типа 5, капсульный полисахарид типа 8, IsdB, IsdA, IsdH, липотейхоевую кислоту, тейхоевую кислоту клеточной стенки, фактор агглютинации A (clfA), поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), липазу, липазу V8, фермент модификации жирных кислот, компоненты поверхности микроорганизмов, узнающие адгезивные молекулы матрикса (например, адгезины, связывающие фибриноген молекулы, связывающий фибронектин белок A, связывающий фибронектин белок B), белок A или их комбинации.

**[00135]** В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию, где одно плечо антитела связывает C1q, и другое плечо связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, биспецифические антигенсвязывающие молекулы связывают антиген-мишень из вида *Staphylococcus* с  $EC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* включает



*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* или *Staphylococcus saprophiticus*. В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему описанию, где одно плечо антитела связывает C1q, и другое плечо связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, биспецифическая антигенсвязывающая молекула стимулирует накопление C1q человека на поверхности вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее.

**[00136]** В соответствии с конкретными иллюстративными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связывают C1q и IsdB. Такие молекулы могут быть обозначены в настоящем описании, например, как биспецифические молекулы «против IsdB/против C1q» или «против IsdBxC1q», или «против IsdB x против C1q», или «IsdBxC1q», или другие сходные термины.

**[00137]** В рамках изобретения, выражение «биспецифическая антигенсвязывающая молекула» обозначает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая, отдельно или в комбинации с одной или несколькими дополнительными CDR и/или FR, специфически связывает конкретный антиген. В контексте настоящего описания, первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, антиген-мишень из вида *Staphylococcus*), и второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, отдельный антиген (например, C1q).

**[00138]** В конкретных иллюстративных вариантах осуществления по настоящему описанию, биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи (HCVR) и вариабельный домен легкой цепи (LCVR).

**[00139]** В конкретных иллюстративных вариантах осуществления по настоящему описанию, биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2). Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть напрямую или опосредованно связаны друг с другом для формирования биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему описанию. Альтернативно, каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена может быть связан с отдельным мультимеризующим доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом способствует ассоциации между двумя антигенсвязывающими доменами, таким образом, формированию биспецифической антигенсвязывающей молекулы. В рамках изобретения, «мультимеризующий домен» представляет собой любые макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, имеющие способность к ассоциации с вторым

мультемеризующим доменом таких же или сходных структуры или состава. Например, мультимемеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен  $C_{H3}$  иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимемеризующего компонента является фрагмент  $F_c$  иммуноглобулина (содержащий домен  $C_{H2}-C_{H3}$ ), например, домен  $F_c$  IgG, выбранный из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, так же как любого аллотипа внутри каждой группы изотипов.

**[00140]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию, как правило, содержат два мультимемеризующих домена, например, два домена  $F_c$ , каждый из которых индивидуально составляет часть отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимемеризующий домены могут принадлежать к одному и тому же изотипу IgG, например, такие как IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй мультимемеризующий домены могут принадлежать к различным изотипам IgG например, такие как IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

**[00141]** В конкретных вариантах осуществления, мультимемеризующий домен представляет собой фрагмент  $F_c$  или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления, мультимемеризующий домен представляет собой остаток цистеина, или короткий содержащий цистеин пептид. Другие мультимемеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля, или суперспирального мотива. В некоторых вариантах осуществления, мультимемеризующий домен может включать изменение аминокислоты в области  $C_{H3}$ , вызывающее формирование выступа на одном мультимемеризующем домене и изменение аминокислоты в области  $C_{H3}$ , вызывающее образование соответствующей впадины на другом мультимемеризующем домене, что обеспечивает образование пары мультимемеризующих доменов. В некоторых вариантах осуществления, изменения аминокислот могут обеспечивать образование пары двух мультимемеризующих доменов посредством зарядов.

**[00142]** Любой формат или технологию биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно использовать для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию. Например, антитело или его фрагмент, имеющие первую специфичность связывания антигена, можно функционально связывать (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими видами молекул, таким как антитело или фрагмент антитела, имеющие вторую специфичность связывания антигена, для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего описания, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или биспецифические форматы диател, слитые белки IgG-scFv, Ig с двойным вариабельным доменом (DVD), антитела квадromы, антитела типа выступ во впадину, антитела с общей легкой цепью (например, общей легкой цепью с выступами во

впадины и т.д.), антитела CrossMab, антитела CrossFab, антитела (SEED), лейциновую застежку, антитела Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab с двойным действием (DAF) и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (см., например, в Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и в процитированных в этом документе ссылках, обзор вышеуказанных форматов).

**[00143]** В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию, мультимеризующие домены, например, домены Fc, могут содержать одно или несколько изменений аминокислот (например, вставок, делеций или замен), по сравнению с относящимся к дикому типу, природным вариантом домена Fc. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим одну или несколько модификаций в домене Fc, приводящим к модифицированному домену Fc, имеющему модифицированное взаимодействие связывания (например, увеличенное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим одну или несколько модификаций в домене Fc, приводящие к модифицированному домену Fc имеющему модифицированное взаимодействие связывания (например, уменьшенное) с белком А.

**[00144]** В одном варианте осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, где модификация увеличивает аффинность домена Fc для FcRn в кислом окружении (например, в эндосоме, где pH лежит в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, Е или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или Т), 254 (например, S или Т) и 256 (например, S/R/Q/E/D или Т); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или К), и/или 434 (например, Н/Ф или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления, модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254Т и 256Е); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

**[00145]** Например, настоящее изобретение относится к антителам против C1q, антителам против IsdB и/или биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, содержащим домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254Т и 256Е (например, M252Y, S254Т и T256Е); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеописанных мутаций домена Fc и других мутаций в переменных доменах антител, описанных в настоящем описании, предусматривают в объеме настоящего изобретения.

**[00146]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый домен  $C_{H3}$  и второй домен  $C_{H3}$  Ig, где первый и второй домены  $C_{H3}$  Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и где по меньшей мере одно отличие аминокислоты уменьшает связывание биспецифической антигенсвязывающей молекулы с белком А, по сравнению с биспецифической антигенсвязывающей молекулой, лишенной отличия аминокислоты. В одном варианте осуществления, первый домен  $C_{H3}$  Ig связывает белок А, и второй домен  $C_{H3}$  Ig содержит мутацию, которая уменьшает или прекращает связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй  $C_{H3}$  может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором  $C_{H3}$ , включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I, согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I, согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I, согласно EU) в случае антител IgG4.

**[00147]** В конкретных вариантах осуществления, домен Fc может являться химерным, объединяющим последовательности Fc, происходящие более, чем из одного изотипа иммуноглобулинов. Например, химерный домен Fc может содержать, частично или полностью, последовательность  $C_{H2}$ , происходящую из области  $C_{H2}$  IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и, частично или полностью, последовательность  $C_{H3}$ , происходящую из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный домен Fc может также содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» последовательность, происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью, происходящей из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного домена Fc, который можно включать в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержит, от N- до C-конца: [ $C_{H1}$  IgG4] - [верхняя шарнирная область IgG4] - [нижняя шарнирная область IgG2] - [ $C_{H2}$  IgG4] - [ $C_{H3}$  IgG4]. Другой пример химерного домена Fc, который можно включать в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержит, от N- до C-конца: [ $C_{H1}$  IgG1] - [верхняя шарнирная область IgG1] - [нижняя шарнирная область IgG2] - [ $C_{H2}$  IgG4] - [ $C_{H3}$  IgG1]. Эти и другие примеры химерных доменов Fc, которые можно включать в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, описаны в US 9359437, поданной 31 января 2014 г. Химерные домены Fc, имеющие эти общие структурные аранжировки, и их варианты, могут иметь измененное связывание рецептора Fc, которое, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

**[00148]** Иллюстративные антигенсвязывающие домены (D1 и D2), которые можно включать в биспецифические антигенсвязывающие молекулы против IsdB x против Clq

по настоящему описанию, включают антигенсвязывающие домены, происходящие из любого из антител против IsdB (D1) и против C1q (D2), описанных в настоящем описании. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00149]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1, содержащий LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

**[00150]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1 и D2, содержащий пару HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3 или таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3 или таблице 1.

**[00151]** В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающие домены D1 и D2, содержащие пару HCVR/LCVR, где D1 из биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит аминокислотную последовательность HCVR, выбранную из любой из последовательностей HCVR в таблице 3, и где D2 из биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит аминокислотную последовательность HCVR, выбранную из любой из последовательностей HCVR в таблице 1, и где аминокислотная последовательность LCVR из биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит любую из аминокислотных последовательностей LCVR, показанных в таблице 1 или 3.

**[00152]** Для целей ясности, биспецифические антитела по настоящему изобретению обобщены в таблице 6, в которой показаны конкретные идентификаторы аминокислотной последовательности для HCVR и HCDR, приписанных первому

антигенсвязывающему домену (D1, против IsdB), идентификаторы аминокислотной последовательности для HCVR и HCDR, приписанных второму антигенсвязывающему домену (D2, против C1q), и идентификаторы аминокислотной последовательности, приписанные LCVR и LCDR. Каждому биспецифическому антителу против IsdB x против C1q приписан новый идентификационный номер антитела (PID), показанный в первом столбце слева.

**[00153]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00154]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1, содержащий CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

**[00155]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3, или по существу сходные с ней последовательности, имеющие по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3 перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней



антигенсвязывающие домены D1 и/или D2, содержащие пару HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1 или 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1 или 3.

**[00160]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1 и/или D2, содержащий набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител против IsdB или против C1q, перечисленных в таблице 1 или таблице 3.

**[00161]** В родственном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1 и/или D2, содержащий набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся внутри пары HCVR/LCVR, как определено в любом из иллюстративных антител против IsdB или против C1q, перечисленных в таблице 1 или таблице 3.

**[00162]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы против IsdB х против C1q по настоящему описанию могут содержать антигенсвязывающий домен D1, происходящий из любого из антител против IsdB из таблицы 3, и антигенсвязывающий домен D2, происходящий из любого из антител против C1q из таблицы 1. Неограничивающие примеры биспецифических антител против IsdB х против C1q по настоящему описанию показаны в таблице 6.

**[00163]** В качестве неограничивающего иллюстративного примера, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB х против C1q, содержащим антигенсвязывающий домен D1 и антигенсвязывающий домен D2, где антигенсвязывающий домен D1 содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 138/146, или набор CDR тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 140-142-144-148-150-152, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2/146, или набор CDR тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 4-6-8-148-150-152. Иллюстративное биспецифическое антитело против IsdB х против C1q, имеющее эти характеристики последовательности, представляет собой биспецифическое антитело, обозначенное H1H20631D, которое содержит D1, происходящий из H1H20295P2, и D2, происходящий из H1 X H17736P2 (см. таблицу 6 в настоящем описании).

#### **Варианты последовательности**

**[00164]** Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию могут содержать одну или несколько замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и



легкой цепи, по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых произошли индивидуальные антигенсвязывающие домены, как описано в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к антигенсвязывающим молекулам, в которых один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами, по сравнению с любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании. Консервативные аминокислотные замены описаны в другом месте настоящего описания.

**[00165]** Настоящее изобретение относится также к антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR и/или CDR, которая является по существу идентичной любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании.

#### **Зависимое от pH связывание**

**[00166]** Настоящее изобретение относится к антителам против C1q, антителам против IsdB и/или биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB и против C1q с характеристиками зависимого от pH связывания. Например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему описанию может иметь уменьшенное связывание с C1q или IsdB при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут иметь увеличенное связывание с C1q или IsdB при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Выражение «кислый pH» включает значения pH менее, чем приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. В рамках изобретения, выражение «нейтральный pH» означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный pH» включает значения pH приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

**[00167]** В конкретных случаях, выражение «уменьшенное связывание... при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH», используют применительно к соотношению значения  $K_D$  для связывания антитела с его антигеном при кислом pH и значения  $K_D$  для связывания антитела с его антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как имеющие «уменьшенное связывание при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH», для целей по настоящему описанию, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет соотношение  $K_D$  при кислом/нейтральном pH приблизительно 3,0 или более. В

конкретных иллюстративных вариантах осуществления, соотношение  $K_D$  при кислом/нейтральном pH для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему описанию может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

**[00168]** Антитела с характеристиками зависимо от pH связывания можно получать, например, посредством скрининга популяции антител по уменьшенному (или увеличенному) связыванию с конкретным антигеном при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут приводить к получению антител с зависимыми от pH характеристиками. Например, посредством замены одной или нескольких аминокислот из антигенсвязывающего домена (например, внутри CDR) на остаток гистидина, можно получать антитело с уменьшенным связыванием антигена при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH.

#### **Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул**

**[00169]** Настоящее изобретение относится к антителам, их антигенсвязывающим фрагментам и биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают компонент комплемента, например, C1q. В некоторых вариантах осуществления, биспецифические антигенсвязывающие молекулы ингибируют связывание C1q с молекулами иммуноглобулинов, ингибируют гемолиз и/или комплементзависимую цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgG1-k человека с  $IC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее. В других вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgM человека с  $IC_{50}$  приблизительно 50 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула ингибирует комплементзависимую цитотоксичность с  $IC_{50}$  приблизительно 100 нМ или менее. В следующих вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула обеспечивает накопление C1q с  $EC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее.

**[00170]** Настоящее изобретение относится к антителам, их антигенсвязывающим фрагментам и биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают антиген-мишень из вида *Staphylococcus*. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* включает *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* и/или *Staphylococcus saprophiticus*. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* представляет собой устойчивый к антибиотикам вид, такой как устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень из вида *Staphylococcus* включает капсульный полисахарид типа 5, капсульный полисахарид типа 8, IsdB, IsdA, IsdH, липотейхоевую кислоту, тейхоевую кислоту клеточной стенки, фактор агглютинации A (clfA), поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG),

липазу, липазу V8, фермент модификации жирных кислот, компоненты поверхности микроорганизмов узнающие адгезивные молекулы матрикса (например, адгезины, связывающие фибриноген молекулы, связывающий фибронектин белок А, связывающий фибронектин белок В), белок А или их комбинации.

**[00171]** В некоторых вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1), который связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*; и второй антигенсвязывающий домен (D2), который связывает C1q человека, связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления, выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен D1; и второй антигенсвязывающий домен D2, стимулирует накопление C1q человека на поверхности вида *Staphylococcus* с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее.

**[00172]** Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека с высокой аффинностью, например, приблизительно 1 нМ или менее. Настоящее изобретение относится также к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают C1q человека с средней или низкой аффинностью, например, приблизительно 2 нМ или более, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных свойств нацеливания, которые являются желательными. Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB с высокой аффинностью, например, приблизительно 5 нМ или менее. Настоящее изобретение относится также к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают IsdB с средней или низкой аффинностью, например, приблизительно 10 нМ или более, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных свойств нацеливания, которые являются желательными.

**[00173]** Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, которые являются способными ингибировать рост или инфекцию для видов *Staphylococcus* у субъекта (см., например, пример 8, пример 9). Например, в соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам против IsdB x против C1q, где однократное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, в дозе приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг или менее) вызывает уменьшение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) вида *Staphylococcus* у субъекта (например, в образце крови, отобранном у субъекта). В конкретных вариантах осуществления, однократное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы против IsdB x против C1q в дозе приблизительно 0,1 мг/кг вызывает увеличение выживаемости животного,

инфицированного *Staphylococcus aureus*, до приблизительно суток 21, приблизительно суток 18, приблизительно суток 14, приблизительно суток 10, приблизительно суток 7, приблизительно суток 5, приблизительно суток 2 или приблизительно суток 1, после введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту.

#### **Эпитопное картирование и родственные технологии**

**[00174]** Эпитоп на C1q или IsdB, с которым связываются биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию, может содержать или состоять из одиночной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот из белка C1q или белка IsdB. Альтернативно, эпитоп может содержать или состоять из множества не являющихся непрерывными аминокислот (или аминокислотных последовательностей) из C1q или IsdB. Антитела по настоящему изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися внутри одной цепи C1q (например, компонента а, b или c), могут взаимодействовать с аминокислотами на двух или более различных цепях C1q, могут взаимодействовать с тримером или могут взаимодействовать с гексамером. Различные способы, известные специалисту в данной области, можно использовать для определения того, взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела «с одной или несколькими аминокислотами» в полипептиде или белке. Иллюстративные способы включают, например, общепринятый анализ перекрестного блокирования, такой как описано в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ аланинового сканирующего мутагенеза, анализ блоттинга пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот внутри полипептида, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водородно-дейтериевый обмен, детектированный посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка, с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить осуществление водородно-дейтериевого обмена на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела, белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и анализу масс-спектрометрии, таким образом, выявляя меченные дейтерием остатки, соответствующие специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгеновскую кристаллографию комплекса антиген/антитело также можно использовать для целей эпитопного картирования.

**[00175]** Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен (D1),

который специфически связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывает компонент комплемента, где первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же самым эпитопом на мишени из вида *Staphylococcus*, что и любой из специфических иллюстративных антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем описании, и/или где второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же самым эпитопом на компоненте комплемента, что и любой из конкретных иллюстративных специфических для C1q антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем описании. Иллюстративные варианты осуществления включают выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с тем же самым эпитопом на C1q человека, что и эталонное антитело, содержащее пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2/146 или SEQ ID NO:106/146. Иллюстративные варианты осуществления включают выделенную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с тем же самым эпитопом на IsdB, что и эталонное антитело, содержащее пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 138/146.

**[00176]** Подобным образом, настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывает IsdB, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывает C1q человека, где первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с IsdB с любым из конкретных иллюстративных специфических для IsdB антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем описании, таких как эталонное антитело, содержащее пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146, и/или где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с C1q человека с любым из конкретных иллюстративных специфических для C1q антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем описании, таких как эталонное антитело, содержащее пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:2/146 или SEQ ID NO:106/146.

**[00177]** Можно легко определять, действительно ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен связывается с тем же самым эпитопом, или конкурирует за связывание с тем же самым эпитопом, что и эталонная антигенсвязывающая молекула по настоящему описанию, с использованием общепринятых способов, известных в данной области. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же самым эпитопом на C1q (или IsdB), что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему описанию, эталонной биспецифической молекуле сначала позволяют связываться с белком C1q (или белком IsdB). Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой C1q (или IsdB). Если тестируемое антитело является способным связываться с C1q (или IsdB) после насыщающего связывания с эталонной

биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно заключить, что тестируемое антитело связывает эпитоп C1q (или IsdB), отличный от эпитопа эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы. С другой стороны, если тестируемое антитело не является способным связываться с молекулой C1q (или IsdB) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же самым эпитопом C1q (или IsdB), что и эпитоп, связываемый эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению. Затем можно проводить дополнительные общепринятые эксперименты (например, анализы мутации и связывания пептидов) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же самым эпитопом, что и эпитоп эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, или является ли стерическое блокирование (или другой феномен) ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты этого рода можно проводить с использованием ELISA, RIA, Bioscore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области. В соответствии с конкретными вариантами осуществления по настоящему описанию, два антигенсвязывающих белка связываются с тем же самым (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно, на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Альтернативно, два антигенсвязывающих белка, по-видимому, связываются с тем же самым эпитопом, если в основном все мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или прекращают связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или прекращают связывание другого. Два антигенсвязывающих белка, по-видимому, имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подгруппа мутаций аминокислот, которые уменьшают или прекращают связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или прекращают связывание другого.

**[00178]** Для определения того, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, вышеописанный способ связывания осуществляют в двух ориентациях: в первой ориентации, эталонной антигенсвязывающей молекуле позволяют связывать белок C1q (или белок IsdB) в условиях насыщения, с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой C1q (или IsdB). Во второй ориентации, тестируемому антителу позволяют связывать молекулу C1q (или IsdB) в условиях насыщения, с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой C1q (или IsdB). Если, в обеих ориентациях, только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула является способной связываться с молекулой C1q (или IsdB), тогда заключают, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая

молекула конкурируют за связывание с C1q (или IsdB). Как понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, может, необязательно, связываться с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания с перекрывающимся или соседним эпитопом.

#### **Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул**

**[00179]** Антигенсвязывающие домены, специфические для конкретных антигенов, можно получать посредством любой технологии получения антител, известной в данной области. После получения, два различных антигенсвязывающих домена, специфические для двух различных антигенов (например, C1q и IsdB), можно соответствующим образом аранжировать друг относительно друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему описанию с использованием общепринятых способов. (Обсуждение иллюстративных форматов биспецифического антитела, которые можно использовать для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию, приведено в другом месте настоящего описания). В конкретных вариантах осуществления, один или несколько из индивидуальных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению происходят из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител.

**[00180]** Способы получения таких антител хорошо известны в данной области. Например, одну или несколько из тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему описанию можно получать с использованием технологии VELOCIMMUNE®. С использованием технологии VELOCIMMUNE® (или любой другой технологии получения человеческих антител), сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела против конкретного антигена (например, C1q или IsdB), имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела характеризуют и отбирают по желательным характеристикам, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области заменяют желательной человеческой константной областью для получения полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые можно включать в биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию.

**[00181]** Полученными способами генной инженерии животных можно использовать для получения человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, неспособную к реаранжировке и экспрессии эндогенной мышиной последовательности переменной легкой цепи иммуноглобулина, где мышь экспрессирует только один или два переменных домена человеческой легкой цепи, кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулина, функционально связанными с мышиным константным геном каппа в эндогенном мышинном локусе каппа. Таких генетически

модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две различные тяжелые цепи, ассоциированные с идентичной легкой цепью, которая содержит переменный домен, происходящий из одного из двух различных фрагментов человеческого гена переменной области легкой цепи. (См., например, в US 2011/0195454 подробное обсуждение таких модифицированных мышей и их применения для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул).

### **Биоэквиваленты**

**[00182]** Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, имеющим аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей иллюстративных молекул, описанных в настоящем описании, но которые сохраняют способность к связыванию C1q и/или IsdB. Такие варианты молекул могут содержать одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот, по сравнению с исходной последовательностью, но имеют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

**[00183]** Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые являются биоэквивалентными любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не отличаются значительно после введения в одинаковой молярной дозе, в сходных экспериментальных условиях, либо в однократных дозах, либо в множественной дозе. Некоторые антигенсвязывающие белки можно считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все еще можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и их считают терапевтически незначимыми для конкретного исследуемого продукта лекарственного средства.

**[00184]** В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не присутствует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

**[00185]** В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно перевести один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшение эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого перевода.



**[00186]** В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба функционируют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения, в той мере, в какой такие механизмы известны.

**[00187]** Биоэквивалентность можно показывать способами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тестирование *in vivo* для человека или других млекопитающих, в ходе которого измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) тестирование *in vitro*, которое коррелирует с данными биодоступности *in vivo* у человека и является целесообразно прогностическим для них; (c) тестирование *in vivo* для человека или других млекопитающих, в ходе которого измеряют соответствующий кратковременный фармакологический эффект антитела (или его мишени) как функцию от времени; и (d) строго контролируемое клиническое исследование, в ходе которого устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

**[00188]** Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, можно конструировать посредством, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей, или делеции концевых или внутренних остатков, или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно делетировать или заменять другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые исключают или удаляют гликозилирование.

### **Иммуноконъюгаты**

**[00189]** Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, конъюгированным с терапевтической группой («иммуноконъюгат»), такой как цитотоксин, химиотерапевтическое средство, иммунодепрессант или радиоактивный изотоп. Цитотоксические средства включают любое средство, которое является вредным для клеток. Примеры пригодных цитотоксических средств и химиотерапевтических средств для формирования иммуноконъюгатов известны в данной области, (см., например, WO 05/103081).

### **Терапевтический состав и введение**

**[00190]** Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению составляют с пригодными

носителями, наполнителями и другими средствами, обеспечивающими улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п.. Множество подходящих составов можно обнаружить в фармакологическом справочнике, известном всем специалистам в области фармацевтической химии: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликолей различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

**[00191]** Дозу антигенсвязывающей молекулы, вводимой пациенту, можно менять в зависимости от возраста и роста пациента, целевого заболевания, условий, способа введения и т.п.. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по настоящему описанию используют для терапевтических целей у взрослого пациента, может обеспечивать преимущества внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему описанию, обычно в однократной дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно, от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частоту и продолжительность лечения можно корректировать. Эффективные дозы и расписания для введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять эмпирически; например, прогресс для пациента можно мониторировать посредством периодической оценки, и корректировать дозу соответственно. Кроме того, межвидовое масштабирование доз можно осуществлять с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

**[00192]** Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но без ограничения, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные и слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным.

**[00193]** Фармацевтическую композицию по настоящему описанию можно доставлять подкожно или внутривенно с использованием стандартных иглы и шприца. Кроме того, применительно к подкожной доставке, шприц-ручку легко можно использовать для доставки фармацевтической композиции по настоящему описанию. Такая шприц-ручка может являться многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке, как правило, используют заменяемый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции, содержащейся в картридже, и опустошения картриджа, пустой картридж легко можно выбросить и заменить на новый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. Шприц-ручку затем можно использовать заново. В одноразовой шприц-ручке нет заменяемого картриджа. Вместо этого, одноразовую шприц-ручку поставляют предварительно заполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения картриджа от фармацевтической композиции, целое устройство выбрасывают.

**[00194]** Многочисленные многоразовые шприц-ручки и автоинжекторы для доставки находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему описанию. Неограничивающие примеры включают AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), если назвать только некоторые из них. Неограничивающие примеры одноразовых шприц-ручек, находящихся применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему описанию, включают шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park IL), если назвать только некоторые из них.

**[00195]** В конкретных ситуациях, фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления, можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления, можно использовать полимерные материалы; см., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте осуществления, систему с контролируемым высвобождением можно помещать вблизи мишени для композиции, что, таким образом, требует только части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с

контролируемым высвобождением обсуждают в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

**[00196]** Пригодные для инъекции препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти пригодные для инъекции препараты можно получать общеизвестными способами. Например, пригодные для инъекции препараты можно получать, например, посредством растворения, суспендирования или эмульгации антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, общепринятых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций, используют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт гидрогенизированного касторового масла полиоксиэтилен (50 моль))] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученным таким образом средством для инъекции, предпочтительно, заполняют подходящую ампулу.

**[00197]** Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального использования, описанные выше, получают в лекарственных формах в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, средства для инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Содержащееся количество вышеуказанного антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции является предпочтительным, чтобы содержание вышеуказанного антитела составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

#### **Терапевтические применения антигенсвязывающих молекул**

**[00198]** Настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста видов *Staphylococcus* у субъекта, включающим введение терапевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает компонент комплемента (например, C1q) и антиген-мишень из вида *Staphylococcus* (например, IsdB), нуждающемуся в этом субъекту. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или их фрагментов, или биспецифических антигенсвязывающих молекул, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В рамках изобретения, выражение «нуждающийся в этом субъект» означает человека или не относящееся к человеку животное, которые имеют один или несколько симптомов или показателей инфекции, или которые могут

иным образом получать преимущество от ингибирования или уменьшения уровня вида *Staphylococcus*.

**[00199]** Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) можно использовать, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором ингибирование, уменьшение роста вида *Staphylococcus* может обеспечивать преимущество. В частности, биспецифические антигенсвязывающие молекулы против IsdB и против C1q по настоящему описанию можно использовать для лечения, предотвращения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с или опосредованного видом *Staphylococcus*. Механизм действия, посредством которого осуществляют терапевтические способы по настоящему изобретению, включают уничтожение клеток, экспрессирующих IsdB, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза, или посредством комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие IsdB или другие антигены-мишени, которые можно ингибировать или уничтожать с использованием биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, включают, например, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* и/или *Staphylococcus saprophiticus*. В некоторых вариантах осуществления, вид *Staphylococcus* представляет собой устойчивый к антибиотику вид, такой как устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus*.

**[00200]** Антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию можно использовать для лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с инфекцией видом *Staphylococcus*, особенно устойчивым к антибиотику видом, включая кожную инфекцию, целлюлит, пневмонию, менингит, инфекцию мочевыводящих путей, синдром токсического шока, эндокардит, перикардит, остеомиелит, бактериемию или сепсис. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему описанию можно также использовать для предотвращения инфекций видом *Staphylococcus*, которые могут возникать во время или после хирургической процедуры, такой как хирургическая процедура, включающая имплантацию протеза. В конкретных вариантах осуществления, протез может представлять собой протез конечности, такой как рука или нога. В конкретных вариантах осуществления, протез может осуществлять замену тазобедренного сустава. В конкретных вариантах осуществления, протез может представлять собой косметический протез, такой как, но без ограничения, глазной протез, силиконовые кисти рук, пальцы рук, молочные железы, ступни, пальцы ног или лицевой имплантат.

#### **Виды комбинированной терапии и составы**

**[00201]** Настоящее изобретение относится к способам, включающим введение фармацевтической композиции, содержащей любое из иллюстративных антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами. Иллюстративные дополнительные лекарственные средства, которые можно

комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по настоящему описанию, включают антибиотик, антитело, которое связывает антиген *Staphylococcus*, антитело, которое связывает токсин *Staphylococcus*, антитело, которое связывает C1q человека или яванского макака, вакцину, специфическую для вида *Staphylococcus*, конъюгат антитела с лекарственным средством (например, биспецифическое антитело, конъюгированное с антибиотиком) или их комбинации.

**[00202]** Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно до, во время или через короткое время после введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему описанию; (для целей по настоящему описанию, такие режимы введения рассматривают как введение антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

**[00203]** Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антигенсвязывающую молекулу по настоящему описанию составляют совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентом(компонентами), как описано в другом месте настоящего описания.

#### **Режимы введения**

**[00204]** В соответствии с конкретными вариантами осуществления по настоящему описанию, множественные дозы антигенсвязывающей молекулы (например, биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает IsdB и C1q) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, включают последовательное введение субъекту множественных доз антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. В рамках изобретения, «последовательное введение» означает, что каждую дозу антигенсвязывающей молекулы вводят субъекту в различных временных точках, например, в различные сутки, разделенных predetermined интервалами (например, часами, сутками, неделями или месяцами). Настоящее изобретение относится к способам, включающим последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, с последующими одной или несколькими вторичными дозами антигенсвязывающей молекулы, и необязательно, с последующими одной или несколькими третичными дозами антигенсвязывающей молекулы.

**[00205]** Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (также обозначенную как «исходная доза»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы все могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но, как правило, могут отличаться друг от друга в отношении частоты введения. В конкретных вариантах осуществления, однако, количества антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальной, вторичных и/или

третичных дозах, отличаются друг от друга (например, скорректированы с увеличением или уменьшением, по необходимости) в ходе лечения. В конкретных вариантах осуществления, две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения в качестве «нагрузочных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводят с меньшей частотой (например, «поддерживающие дозы»).

**[00206]** В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему описанию, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) суток после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», в рамках изобретения, означает, в последовательности из множества введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту перед введением ближайшей следующей дозы в последовательности, без доз между ними.

**[00207]** Способы, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает IsdB и C1q). Например, в конкретных вариантах осуществления, только однократную вторичную дозу вводят пациенту. В других вариантах осуществления, две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз вводят пациенту. Подобным образом, в конкретных вариантах осуществления, только однократную третичную дозу вводят пациенту. В других вариантах осуществления, две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз вводят пациенту.

**[00208]** В некоторых вариантах осуществления, включающих множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с такой же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Подобным образом, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с такой же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частоту, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, можно менять на протяжении режима лечения. Частоту введения может также корректировать терапевт на протяжении режима лечения, в зависимости от нужд индивидуального пациента после клинического обследования.

## **ПРИМЕРЫ**

**[00209]** Следующие примеры приведены, чтобы предоставить специалисту в данной области полное раскрытие и описание того, как осуществлять и использовать способы и композиции по настоящему описанию, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение. Предприняты

усилия для обеспечения точности применительно к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), однако следует учитывать некоторые ошибки эксперимента и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, и давление составляет атмосферное или около него.

### **Пример 1. Получение антител против C1q**

**[00210]** Антитела против C1q получали посредством иммунизации мыши VELOCIMMUNE<sup>®</sup> (т.е., сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи kappa иммуноглобулина человека; См. US6596541) компонентом комплемента 1q (C1q) человека. Компонент комплемента C1q человека представляет собой гексамер, содержащий три уникальные субъединицы: А (29 кДа); В (26 кДа); и С (22 кДа). Иллюстративная последовательность субъединицы А обнаружена в аминокислотах 1-245 из номера доступа NP\_057075 (SEQ ID NO:170). Иллюстративная последовательность субъединицы В обнаружена в аминокислотах 1-253 из номера доступа NP\_000482 (SEQ ID NO:171). Иллюстративная последовательность субъединицы С обнаружена в аминокислотах 1-245 из номера доступа NP\_758957 (SEQ ID NO:172). C1q человека также является коммерчески доступным из такого источника, как Quidel. В некоторых вариантах осуществления, коммерчески доступный C1q человека из Quidel использовали в качестве иммуногена. Иммунный ответ антитела мониторируют посредством специфического для C1q иммуноанализа.

**[00211]** Несколько полностью человеческих антител против C1q выделены непосредственно из положительных по антигену В-клеток от мыши VELOCIMMUNE<sup>®</sup> без слияния с клетками миеломы, как описано в US7582298. Антитела, как правило, обозначены в настоящем описании в соответствии со следующей номенклатурой: приставка Fc (например, «H1H», «H1xH» и т.д.), за которой следует цифровой идентификатор (например, «2712», «2692», и т.д., как показано в таблице 1), за которым следует суффикс «Р» или «D». Обозначение «H1 X H» относится к антителу, Fc которого подвергнут модификации/мутации для исключения связывания с белком А. Иллюстративные модификации доменов Fc, обеспечивающие антитела, которые не связываются с белком А, описаны в другом месте настоящего описания. Приставки H1H и H1xH в обозначениях антител, используемые в настоящем описании, обозначают конкретный изотип области Fc антитела. Например, антитело «H1H» имеет Fc IgG1 человека, и антитело «H1xH» имеет мутантный Fc (См. US8586713). Все переменные области являются полностью человеческими, как обозначено посредством первого «H» в обозначении антитела. Как понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, можно перевести в антитело с отличным изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно перевести в антитело с IgG4 человека, и т.д.), но в любом случае, переменные домены (включая CDR) - указанные посредством цифровых идентификаторов, показанных в таблице 1 - остаются такими же, и ожидают, что свойства



связывания являются идентичными или по существу сходными, независимо от природы домена Fc.

**[00212]** После выделения антител, получены последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности. Идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (HCDR1), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (HCDR2), определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (HCDR3), вариабельной области легкой цепи (LCVR), определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (LCDR1), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (LCDR2), определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (LCDR3) антител против C1q показаны в таблице 1 ниже. Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты показаны в таблице 2.

**Таблица 1** Идентификаторы аминокислотной последовательности для антител против hC1q

**Таблица 1** Идентификаторы аминокислотной последовательности для антител против hC1q

| Обозначение антитела | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|----------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| H1xH17736P2          | 2    | 4     | 6     | 8     | 146  | 148   | 150   | 152   |
| H1xH17738P2          | 10   | 12    | 14    | 16    | 146  | 148   | 150   | 152   |
| H1xH17751P2          | 18   | 20    | 22    | 24    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17756P2          | 26   | 28    | 30    | 32    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17758P2          | 34   | 36    | 38    | 40    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17760P2          | 42   | 44    | 46    | 48    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17763P2          | 50   | 52    | 54    | 56    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17769P2          | 58   | 60    | 62    | 64    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17773P2          | 66   | 68    | 70    | 72    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17779P2          | 74   | 76    | 78    | 80    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH17781P2          | 82   | 84    | 86    | 88    | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH18392P2          | 90   | 92    | 94    | 96    | 146  | 148   | 150   | 152   |
| H1xH18394P2          | 98   | 100   | 102   | 104   | 146  | 148   | 150   | 152   |
| H1xH18395P2          | 106  | 108   | 110   | 112   | 146  | 148   | 150   | 152   |
| H1xH18400P2          | 114  | 116   | 118   | 120   | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH18411P2          | 122  | 124   | 126   | 128   | 162  | 164   | 166   | 168   |
| H1xH18412P2          | 130  | 132   | 134   | 136   | 162  | 164   | 166   | 168   |

**Таблица 2** Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты для антител против hC1q

| Обозначение антитела | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|----------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| H1xH17736P2          | 1    | 3     | 5     | 7     | 145  | 147   | 149   | 151   |
| H1xH17738P2          | 9    | 11    | 13    | 15    | 145  | 147   | 149   | 151   |

|             |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| H1xH17751P2 | 17  | 19  | 21  | 23  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17756P2 | 25  | 27  | 29  | 31  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17758P2 | 33  | 35  | 37  | 39  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17760P2 | 41  | 43  | 45  | 47  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17763P2 | 49  | 51  | 53  | 55  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17769P2 | 57  | 59  | 61  | 63  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17773P2 | 65  | 67  | 69  | 71  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17779P2 | 73  | 75  | 77  | 79  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH17781P2 | 81  | 83  | 85  | 87  | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH18392P2 | 89  | 91  | 93  | 95  | 145 | 147 | 149 | 151 |
| H1xH18394P2 | 97  | 99  | 101 | 103 | 145 | 147 | 149 | 151 |
| H1xH18395P2 | 105 | 107 | 109 | 111 | 145 | 147 | 149 | 151 |
| H1xH18400P2 | 113 | 115 | 117 | 119 | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH18411P2 | 121 | 123 | 125 | 127 | 161 | 163 | 165 | 167 |
| H1xH18412P2 | 129 | 131 | 133 | 135 | 161 | 163 | 165 | 167 |

### **Пример 2. Получение антител против IsdB**

**[00213]** Антитела против IsdB получали посредством иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е., сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа иммуноглобулина человека, См. US6596541) антигеном, полученным из белка утилизации гема IsdB из *Staphylococcus aureus* (IsdB). Один вариант осуществления антигена содержит аминокислоты 41-613 из номера доступа WP\_063557416. Одним примером аминокислотной последовательности антигена IsdB являются аминокислоты 3-574 из SEQ ID NO:169. Иммунный ответ антитела мониторировали посредством специфического для IsdB иммуноанализа.

**[00214]** Несколько полностью человеческих антител против IsdB выделены непосредственно из положительных по антигену В-клеток от мыши VELOCIMMUNE® без слияния с клетками миеломы, как описано в US7582298. После выделения антител, получены последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности. Идентификаторы аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи (HCVR), определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (HCDR1), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (HCDR2), определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (HCDR3), переменной области легкой цепи (LCVR), определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (LCDR1), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (LCDR2), определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (LCDR3) антител против IsdB показаны в таблице 3 ниже. Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты показаны в таблице 4.

**Таблица 3** Идентификаторы аминокислотной последовательности для антител против IsdB

| Обозначение антитела | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|----------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| H1xH20295P2          | 138  | 140   | 142   | 144   | 146  | 148   | 150   | 152   |
| H1xH20318P2          | 154  | 156   | 158   | 160   | 162  | 164   | 166   | 168   |

**Таблица 4** Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты для антител против IsdB

| Обозначение антитела | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|----------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| H1xH20295P2          | 137  | 139   | 141   | 143   | 145  | 147   | 149   | 151   |
| H1xH20318P2          | 153  | 155   | 157   | 159   | 161  | 163   | 165   | 167   |

### **Пример 3. Получение биспецифического антитела против C1q и против IsdB**

**[00215]** Биспецифические антитела, содержащие специфический против C1q связывающий домен и специфический против IsdB связывающий домен, конструировали с использованием стандартных способов, в которых тяжелую цепь и легкую цепь из антитела против C1q комбинировали с тяжелой цепью и легкой цепью из антитела против IsdB. Антитела против C1q, использованные для конструирования биспецифических антител из этого примера, получали посредством иммунизации мыши VelocImmune®, как описано в примере 1. Антитела против IsdB, использованные для конструирования биспецифических антител из этого примера, получали, как описано в примере 2.

**[00216]** Биспецифические антитела, полученные в соответствии с настоящим примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т.е., связывающих плеча), D1 и D2. В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен (D1) содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), полученную из антитела против IsdB («IsdB-VH»), образующую пару с вариабельной областью легкой цепи (LCVR), и образует антигенсвязывающий домен, который специфически узнает белок IsdB *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления, второй антигенсвязывающий домен (D2) содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), полученную из антитела против C1q («C1q-VH»), образующую пару с вариабельной областью легкой цепи (LCVR), и образует антигенсвязывающий домен, который специфически узнает C1q человека. Специалисту в данной области понятно, что биспецифические антитела можно конструировать в многих других форматах, включая одноцепочечные Fv, перенацеливаемые белки с двойной аффинностью, tandemные диатела, образование пар выступа и впадины, образование пар по заряду, перекрестные Mab, Ig с двойными вариабельными доменами, s-Fab и Fv-Fc. Список идентификаторов каждого из плеч и биспецифических антител представлен в таблице 5. Идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельных доменов и CDR тяжелой цепи каждого плеча биспецифических антител показаны в таблице 6.

**Таблица 5**

| Но. идентификатора биспецифического Ab | Но. идентификатора антитела против C1q | Но. идентификатора антитела против IsdB |
|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|

|           |               |              |
|-----------|---------------|--------------|
| H1H20631D | H1xH17736P2VH | H1H20295P2VH |
| H1H20632D | H1xH17738P2VH | H1H20295P2VH |
| H1H20633D | H1xH18392P2VH | H1H20295P2VH |
| H1H20634D | H1xH18394P2VH | H1H20295P2VH |
| H1H20635D | H1xH18395P2VH | H1H20295P2VH |
| H1H20636D | H1xH17773P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20637D | H1xH17779P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20638D | H1xH17781P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20639D | H1xH17751P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20640D | H1xH17756P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20641D | H1xH17758P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20642D | H1xH17760P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20643D | H1xH17763P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20644D | H1xH17769P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20645D | H1xH18400P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20646D | H1xH18411P2VH | H1H20318P2VH |
| H1H20647D | H1xH18412P2VH | H1H20318P2VH |

Таблица 6 ID аминокислотной последовательности

| Биспецифическое антитело против IsdB x против C1q | Первый антигенсвязывающий домен (D1, против IsdB) |           |           |           | Второй антигенсвязывающий домен (D2, против C1q) |           |           |           | Вариабельная область легкой цепи (D3, V $\square$ ) |           |           |           |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                                   | D1-HCV R                                          | D1-HCDR 1 | D1-HCDR 2 | D1-HCDR 3 | D2-HCV R                                         | D2-HCDR 1 | D2-HCDR 2 | D2-HCDR 3 | D3-LCVR                                             | D3-LCDR 1 | D3-LCDR 2 | D3-LCDR 3 |
| H1H20631D                                         | H1H20295P2VH                                      |           |           |           | H1xH17736P2VH                                    |           |           |           | H1H20295P2VK                                        |           |           |           |
|                                                   | 138                                               | 140       | 142       | 144       | 2                                                | 4         | 6         | 8         | 146                                                 | 148       | 150       | 152       |
| H1H20632D                                         | H1H20295P2VH                                      |           |           |           | H1xH17738P2VH                                    |           |           |           | H1H20295P2VK                                        |           |           |           |
|                                                   | 138                                               | 140       | 142       | 144       | 10                                               | 12        | 14        | 16        | 146                                                 | 148       | 150       | 152       |
| H1H20633D                                         | H1H20295P2VH                                      |           |           |           | H1xH18392P2VH                                    |           |           |           | H1H20295P2VK                                        |           |           |           |
|                                                   | 138                                               | 140       | 142       | 144       | 90                                               | 92        | 94        | 96        | 146                                                 | 148       | 150       | 152       |
| H1H20634D                                         | H1H20295P2VH                                      |           |           |           | H1xH18394P2VH                                    |           |           |           | H1H20295P2VK                                        |           |           |           |
|                                                   | 138                                               | 140       | 142       | 144       | 98                                               | 100       | 102       | 104       | 146                                                 | 148       | 150       | 152       |
| H1H20635D                                         | H1H20295P2VH                                      |           |           |           | H1xH18395P2VH                                    |           |           |           | H1H20295P2VK                                        |           |           |           |
|                                                   | 138                                               | 140       | 142       | 144       | 106                                              | 108       | 110       | 112       | 146                                                 | 148       | 150       | 152       |
| H1H20636D                                         | H1H20318P2VH                                      |           |           |           | H1xH17773P2VH                                    |           |           |           | H1H20318P2VK                                        |           |           |           |
|                                                   | 154                                               | 156       | 158       | 160       | 66                                               | 68        | 70        | 72        | 162                                                 | 164       | 166       | 168       |
| H1H20637D                                         | H1H20318P2VH                                      |           |           |           | H1xH17779P2VH                                    |           |           |           | H1H20318P2VK                                        |           |           |           |

|               |              |     |     |     |               |     |     |     |              |     |     |     |
|---------------|--------------|-----|-----|-----|---------------|-----|-----|-----|--------------|-----|-----|-----|
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 74            | 76  | 78  | 80  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2063<br>8D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17781P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 82            | 84  | 86  | 88  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2063<br>9D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17751P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 18            | 20  | 22  | 24  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>0D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17756P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 26            | 28  | 30  | 32  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>1D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17758P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 34            | 36  | 38  | 40  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>2D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17760P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 42            | 44  | 46  | 48  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>3D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17763P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 50            | 52  | 54  | 56  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>4D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH17769P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 58            | 60  | 62  | 64  | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>5D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH18400P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 114           | 116 | 118 | 120 | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>6D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH18411P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 122           | 124 | 126 | 128 | 162          | 164 | 166 | 168 |
| H1H2064<br>7D | H1H20318P2VH |     |     |     | H1xH18412P2VH |     |     |     | H1H20318P2VK |     |     |     |
|               | 154          | 156 | 158 | 160 | 130           | 132 | 134 | 136 | 162          | 164 | 166 | 168 |

**Пример 4:** Кинетика связывания C1q человека и IsdB-6xHis с биспецифическими антителами против IsdB х против C1q при 25°C и 37°C

**[00217]** Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для связывания C1q человека (Quidel) и IsdB-6xHis (REGN2655; См. также SEQ ID NO: 169) с соответствующими C1q и IsdB плечами очищенных биспецифических антител против IsdB х против C1q определяли с использованием биосенсора для поверхностного плазмонного резонанса с детекцией в реальном времени (Biacore 4000). Поверхность сенсора CM5 Biacore дериватизировали посредством присоединения по аминокислоте моноклонального антитела мыши против Fc человека (GE Healthcare, #BR-1008-39) для связывания очищенных биспецифических антител против IsdB х против C1q. Все исследования связывания Biacore проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20 (буфер для анализа). Нативный белок компонент комплемента C1q человека, очищенный из сыворотки человека, закупленный из Quidel и обозначенный в настоящем описании как

hC1q, тестировали в концентрациях в диапазоне от 0,6 нМ до 20 нМ. Рекомбинантный бактериальный IsdB, экспрессированный с гексагистидиновой меткой (IsdB-6xHis; REGN2655; SEQ ID NO:169; WP\_063557416.1), далее обозначенный в настоящем описании как IsdB-6xHis, тестировали в концентрациях в диапазоне 0,37 нМ - 90 нМ и инъецировали над поверхностью со связанным биспецифическим антителом против IsdB х против C1q при скорости потока 30 мкл/минуту. Связывание антитело-реагент мониторировали в течение 3 минут, в то время как диссоциацию мониторировали в течение 5 минут. Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25°C или 37°C. Кинетические константы скорости связывания ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли посредством приведения сенсограмм в реальном времени в соответствие с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации для связывания ( $K_D$ ) и периоды времени полужизни при диссоциации ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали из кинетических констант скорости как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

NB относится к отсутствию связывания, наблюдаемому в условиях эксперимента.

#### Результаты и заключения

**[00218]** Как показано в таблице 7, при 25°C, все из 17 антител против IsdB х против C1q по настоящему изобретению связывались с hC1q с значениями  $K_D$  в диапазоне 11,4 пМ - 2,12 нМ. Как показано в таблице 8, при 25°C, все из 17 антител против IsdB х против C1q по настоящему изобретению связывались с IsdB-6xHis с значениями  $K_D$  в диапазоне 1,70 нМ - 12,3 нМ. Как показано в таблице 9, при 37°C, все из 17 антител против IsdB х против C1q по настоящему изобретению связывались с hC1q с значениями  $K_D$  в диапазоне 50,1 пМ - 5,01 нМ. Как показано в таблице 10, при 37°C, все из 17 антител против IsdB х против C1q по настоящему изобретению связывались с IsdB-6xHis с значениями  $K_D$  в диапазоне от 3,33 нМ до 21,5 нМ. Связывание hC1q и IsdB-6xHis с антителом для (отрицательного) контроля изотипа (REGN1932) не наблюдали в условиях эксперимента, описанных выше.

**Таблица 7:** Полученная с использованием Biacore кинетика связывания hC1q с плечом для C1q биспецифических антител против IsdB х против C1q при 25°C

| ID антитела | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (с <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $t_{1/2}$ (мин) |
|-------------|------------------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|
| H1H20631D   | 7,24E+06                                 | 1,65E-03                 | 2,28E-10         | 7,01            |
| H1H20632D   | 1,08E+07                                 | 3,18E-03                 | 2,94E-10         | 3,64            |
| H1H20633D   | 1,28E+07                                 | 3,48E-03                 | 2,71E-10         | 3,32            |
| H1H20634D   | 1,00E+07                                 | 2,27E-04                 | 2,26E-11         | 50,9            |
| H1H20635D   | 1,46E+07                                 | 4,52E-03                 | 3,09E-10         | 2,56            |
| H1H20636D   | 4,81E+06                                 | 1,02E-02                 | 2,12E-09         | 1,14            |
| H1H20637D   | 8,01E+06                                 | 1,24E-02                 | 1,54E-09         | 0,93            |
| H1H20638D   | 4,01E+06                                 | 5,11E-03                 | 1,28E-09         | 2,26            |
| H1H20639D   | 9,35E+06                                 | 6,12E-03                 | 6,55E-10         | 1,89            |
| H1H20640D   | 1,88E+07                                 | 6,87E-04                 | 3,65E-11         | 16,8            |

|           |          |          |          |      |
|-----------|----------|----------|----------|------|
| H1H20641D | 4,38E+06 | 6,80E-04 | 1,54E-10 | 17,1 |
| H1H20642D | 1,72E+07 | 1,96E-04 | 1,14E-11 | 58,9 |
| H1H20643D | 9,94E+06 | 1,30E-02 | 1,31E-09 | 0,89 |
| H1H20644D | 2,69E+07 | 6,24E-03 | 2,32E-10 | 1,85 |
| H1H20645D | 2,86E+07 | 4,52E-03 | 1,58E-10 | 2,56 |
| H1H20646D | 1,76E+07 | 4,87E-03 | 2,78E-10 | 2,37 |
| H1H20647D | 9,25E+06 | 3,40E-03 | 3,68E-10 | 3,39 |
| REGN1932  | NB       | NB       | NB       | NB   |

**Таблица 8:** Полученная с использованием Biacore кинетика связывания IsdB-6xHis с плечом для IsdB биспецифических антител против IsdB x против C1q при 25°C

| ID антитела | $k_a$ (M $s^{-1}$ ) | $k_d$ (s $^{-1}$ ) | $K_D$ (молярная) | $t_{1/2}$ (мин) |
|-------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|
| H1H20631D   | 1,15E+05            | 2,70E-04           | 2,36E-09         | 42,8            |
| H1H20632D   | 1,15E+05            | 2,55E-04           | 2,21E-09         | 45,2            |
| H1H20633D   | 1,21E+05            | 2,47E-04           | 2,04E-09         | 46,9            |
| H1H20634D   | 1,12E+05            | 2,96E-04           | 2,65E-09         | 39,0            |
| H1H20635D   | 1,20E+05            | 2,04E-04           | 1,70E-09         | 56,6            |
| H1H20636D   | 7,58E+04            | 3,78E-04           | 4,98E-09         | 30,6            |
| H1H20637D   | 5,01E+04            | 4,68E-04           | 9,34E-09         | 24,7            |
| H1H20638D   | 4,62E+04            | 4,98E-04           | 1,08E-08         | 23,2            |
| H1H20639D   | 4,98E+04            | 5,62E-04           | 1,13E-08         | 20,5            |
| H1H20640D   | 5,91E+04            | 5,53E-04           | 9,36E-09         | 20,9            |
| H1H20641D   | 7,28E+04            | 4,38E-04           | 6,02E-09         | 26,4            |
| H1H20642D   | 6,07E+04            | 5,01E-04           | 8,26E-09         | 23,0            |
| H1H20643D   | 5,89E+04            | 5,55E-04           | 9,42E-09         | 20,8            |
| H1H20644D   | 5,03E+04            | 5,54E-04           | 1,10E-08         | 20,8            |
| H1H20645D   | 5,54E+04            | 5,51E-04           | 9,95E-09         | 21,0            |
| H1H20646D   | 4,45E+04            | 4,33E-04           | 9,74E-09         | 26,7            |
| H1H20647D   | 4,60E+04            | 5,65E-04           | 1,23E-08         | 20,4            |
| REGN1932    | NB                  | NB                 | NB               | NB              |

**Таблица 9:** Полученная с использованием Biacore кинетика связывания hC1q с плечом для C1q биспецифических антител против IsdB x против C1q при 37°C

| ID антитела | $k_a$ (M $s^{-1}$ ) | $k_d$ (s $^{-1}$ ) | $K_D$ (молярная) | $t_{1/2}$ (мин) |
|-------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|
| H1H20631D   | 1,16E+07            | 2,22E-03           | 1,93E-10         | 5,19            |
| H1H20632D   | 4,99E+07            | 8,71E-03           | 1,75E-10         | 1,33            |
| H1H20633D   | 2,61E+07            | 1,27E-02           | 4,87E-10         | 0,91            |
| H1H20634D   | 7,86E+06            | 4,03E-04           | 5,13E-11         | 28,7            |
| H1H20635D   | 2,41E+07            | 1,74E-02           | 7,23E-10         | 0,66            |
| H1H20636D   | 6,57E+06            | 1,79E-02           | 2,73E-09         | 0,64            |
| H1H20637D   | 1,75E+07            | 4,07E-02           | 2,33E-09         | 0,28            |
| H1H20638D   | 5,53E+06            | 1,10E-02           | 1,98E-09         | 1,05            |
| H1H20639D   | 1,29E+07            | 8,59E-03           | 6,64E-10         | 1,34            |
| H1H20640D   | 1,09E+07            | 1,51E-03           | 1,39E-10         | 7,67            |
| H1H20641D   | 1,50E+06            | 2,70E-04           | 1,80E-10         | 42,9            |
| H1H20642D   | 8,23E+06            | 4,12E-04           | 5,01E-11         | 28,0            |
| H1H20643D   | 8,13E+06            | 4,07E-02           | 5,01E-09         | 0,28            |
| H1H20644D   | 2,98E+07            | 2,76E-02           | 9,24E-10         | 0,42            |
| H1H20645D   | 3,60E+07            | 3,17E-02           | 8,80E-10         | 0,36            |
| H1H20646D   | 9,91E+06            | 1,29E-02           | 1,30E-09         | 0,90            |

|           |          |          |          |      |
|-----------|----------|----------|----------|------|
| H1H20647D | 1,31E+07 | 5,76E-03 | 4,39E-10 | 2,00 |
| REGN1932  | NB       | NB       | NB       | NB   |

**Таблица 10:** Полученная с использованием Biacore кинетика связывания IsdB-6xHis с плечом для IsdB биспецифических антител против IsdB x против C1q при 37°C

| ID антитела | $k_a$ (M $c^{-1}$ ) | $k_d$ (c $^{-1}$ ) | $K_D$ (молярная) | $t_{1/2}$ (мин) |
|-------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|
| H1H20631D   | 1,63E+05            | 5,57E-04           | 3,43E-09         | 20,7            |
| H1H20632D   | 1,54E+05            | 5,27E-04           | 3,41E-09         | 21,9            |
| H1H20633D   | 1,59E+05            | 5,40E-04           | 3,41E-09         | 21,4            |
| H1H20634D   | 1,50E+05            | 5,73E-04           | 3,81E-09         | 20,2            |
| H1H20635D   | 1,56E+05            | 5,20E-04           | 3,33E-09         | 22,2            |
| H1H20636D   | 8,28E+04            | 1,44E-03           | 1,74E-08         | 8,04            |
| H1H20637D   | 8,51E+04            | 1,49E-03           | 1,74E-08         | 7,78            |
| H1H20638D   | 8,09E+04            | 1,44E-03           | 1,78E-08         | 8,03            |
| H1H20639D   | 8,02E+04            | 1,48E-03           | 1,85E-08         | 7,81            |
| H1H20640D   | 8,28E+04            | 1,42E-03           | 1,72E-08         | 8,13            |
| H1H20641D   | 9,59E+04            | 1,41E-03           | 1,47E-08         | 8,19            |
| H1H20642D   | 8,46E+04            | 1,41E-03           | 1,67E-08         | 8,19            |
| H1H20643D   | 7,99E+04            | 1,48E-03           | 1,85E-08         | 7,81            |
| H1H20644D   | 8,25E+04            | 1,50E-03           | 1,82E-08         | 7,70            |
| H1H20645D   | 8,12E+04            | 1,55E-03           | 1,91E-08         | 7,43            |
| H1H20646D   | 8,07E+04            | 1,50E-03           | 1,85E-08         | 7,72            |
| H1H20647D   | 7,15E+04            | 1,54E-03           | 2,15E-08         | 7,51            |
| REGN1932    | NB                  | NB                 | NB               | NB              |

#### Пример 5 ELISA блокирования

**[00219]** Компонент комплемента C1q представляет собой циркулирующий гексамер, который узнает и связывает иммуноглобулин в комплексе с антигеном, таким образом, инициируя каскад реакций комплемента. Антитела против C1q выделяли и затем использовали в конструировании биспецифических антител с двойным связыванием с C1q человека и IsdB, регулируемым железом белком с поверхностной детерминантой В *Staphylococcus aureus*, эволюционировавшим для извлечения железа из гемоглобина. Способность биспецифических антител против IsdB x против C1q блокировать связывание нативного компонента комплемента C1q человека с его природными лигандами, IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека и IgM человека, измеряли с использованием анализов конкурентного сэндвич-ELISA.

#### Способы

**[00220]** Нативный белок компонент комплемента C1q человека, очищенный из сыворотки человека, закупали из Quidel и метили биотином (biot-hC1q). IgG1 каппа человека (hIgG1-k, Sigma Aldrich), IgG2 каппа человека (hIgG2-k, EMD Millipore), IgG3 каппа человека (hIgG3-k, EMD Millipore) и цельная молекула IgM человека (Jackson ImmunoResearch) являлись очищенными из плазмы или мочи человека. В качестве отрицательного контроля изотипа для биспецифических антител против IsdB x против C1q, антитело IgG1 человека против Fel d 1 (REGN 1932) включали для фонового связывания с покрытием иммуноглобулинов. Тестируемые антитела показаны в таблице 6.



**[00221]** Эксперименты проводили с использованием следующего способа. Человеческими иммуноглобулинами по отдельности, в концентрации 2 мкг/мл для hIgG1-k, hIgG2-k, hIgG3-k или 5 мкг/мл для hIgM в PBS, покрывали 96-луночный микропланшет для титрования в течение ночи при 4°C. Затем участки неспецифического связывания блокировали с использованием 0,5% (масс./об.) раствора BSA в PBS. В другом микропланшете для титрования, постоянное количество белка biot-hC1q (30 пМ для блокирования hIgG1-k, hIgG3-k или 6 нМ для блокирования hIgG2-k, hIgM) смешивали с биспецифическими антителами против IsdB x против C1q или с антителом для контроля изотипа в диапазоне концентраций (508 фМ - 30 нМ для блокирования hIgG1-k, hIgG3-k или 10 пМ - 600 нМ для блокирования hIgG2-k, hIgM). Постоянные концентрации biot-hC1q для анализа ингибирования антитела выбирали из приблизительной средней точки в линейной части индивидуальных кривых связывания biot-hC1q с планшетом, покрытым hIgG1-k, hIgG2-k, hIgG3-k или hIgM.

**[00222]** Образец без постоянной концентрации hC1q включали для определения фонового сигнала, и растворы без антитела, но содержащие 30 пМ или 6 нМ белок biot-hC1q, также тестировали для измерения сигнала связывания только постоянной концентрации. Комплексы антитело-белок с постоянной концентрацией 30 пМ белка biot-hC1q переносили в микропланшеты для титрования, покрытые hIgG1-k или hIgG3, и комплексы антитело-белок с постоянной концентрацией 6 нМ biot-hC1q переносили в планшеты, покрытые hIgG2-k или hIgM. После инкубации в течение одного часа при комнатной температуре, лунки промывали, и связанный с планшетом biot-hC1q детектировали с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (Thermo Scientific). Затем планшеты проявляли с использованием раствора субстрата TMB (BD Biosciences), в соответствии с рекомендациями производителя, и оптическую плотность при 450 нм измеряли в считывателе для планшетов Victor X4 (PerkinElmer).

**[00223]** Анализ данных проводили с использованием сигмоидной модели зависимости ответа от дозы в составе программного обеспечения Prism™ (GraphPad). Рассчитанное значение IC<sub>50</sub>, определенное как концентрация антитела, необходимая для уменьшения на 50% связывания C1q с иммуноглобулинами, использовали в качестве показателя активности блокирования. Рассчитывали процент блокирования при максимальной концентрации антитела, тестируемой в каждом анализе. При расчете, сигнал связывания для образца с 30 пМ или 6 нМ biot-hC1q в отсутствие антитела, принимали за 100% связывания или 0% блокирования; и фоновый сигнал для образца буфера без biot-hC1q или антитела принимали за 0% связывания или 100% блокирования.

### **Результаты и заключения**

**[00224]** Результаты блокирования обобщены в таблице 11, где антитела организованы в три группы, на основании их способности блокировать связывание C1q с поверхностями с индивидуальным или множественным покрытием. % блокирования регистрировали для всех антител и рассчитывали при наивысшей концентрации, тестируемой в каждом анализе, как указано в названиях столбцов. Отрицательный

максимальный % блокирования указывает на увеличение связывания biot-hC1q, детектированное в присутствии антитела. Значения  $IC_{50}$  показаны только для антител, блокирующих >50% связывания C1q с hIgG1-k, hIgG2-k, IgG3-k или IgM, и знаки минус обозначают антитела, блокирующие < 50% при наивысшей тестируемой концентрации. Значения  $IC_{50}$  зарегистрированы как неубедительные (INC) для антител с кривыми ингибирования, для которых не удалось подобрать соответствие 4-параметрическому логистическому уравнению из программного обеспечения Prism™. Девять из семнадцати тестируемых биспецифических антител против IsdB x против C1q по настоящему изобретению идентифицированы как блокирующие >50% связывания белка biot-hC1q с лигандами hIgG1-k, hIgG2-k, hIgG3-k и hIgM. Эти биспецифические антитела против IsdB x против C1q блокировали связывание 30 пМ biot-hC1q с hIgG1-k и hIgG3-k, и связывание 6 нМ biot-C1q с hIgG2-k и hIgM с значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 110 пМ до 83 нМ и % блокирования в диапазоне от 53% до 99%.

Таблица 11

|                    |                                           | Блокирование посредством биспецифического Ab 30 пМ biot-hC1q |                             |                                                           | Блокирование посредством биспецифического Ab 6 нМ biot-hC1q |                                                            |                          |                                                            |
|--------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| Биспецифические Ab | Покрывание планшета hIgG1-k               |                                                              | Покрывание планшета hIgG3-k |                                                           | Покрывание планшета hIgG2-k                                 |                                                            | Покрывание планшета hIgM |                                                            |
|                    | $IC_{50}$ (М)                             | % блокирования с использованием 30 нМ биспецифического Ab    | $IC_{50}$ (М)               | % блокирования с использованием 30 нМ биспецифического Ab | $IC_{50}$ (М)                                               | % блокирования с использованием 600 нМ биспецифического Ab | $IC_{50}$ (М)            | % блокирования с использованием 600 нМ биспецифического Ab |
|                    | Блокировано >50% во всех форматах анализа |                                                              |                             |                                                           |                                                             |                                                            |                          |                                                            |
| H1H20632D          | INC                                       | 90                                                           | 8,3E-08                     | 86                                                        | 2,3E-08                                                     | 88                                                         | 1,8E-08                  | 97                                                         |
| H1H20633D          | 1,6E-09                                   | 93                                                           | 4,8E-09                     | 84                                                        | 8,2E-09                                                     | 79                                                         | 6,4E-09                  | 96                                                         |
| H1H20634D          | 2,8E-10                                   | 96                                                           | 9,6E-10                     | 99                                                        | 4,2E-09                                                     | 92                                                         | 3,8E-09                  | 97                                                         |
| H1H20635D          | INC                                       | 87                                                           | INC                         | 53                                                        | 1,6E-08                                                     | 84                                                         | 1,2E-08                  | 93                                                         |
| H1H20640D          | 2,2E-10                                   | 86                                                           | 1,1E-09                     | 92                                                        | 7,7E-09                                                     | 79                                                         | 5,1E-09                  | 79                                                         |
| H1H20642D          | 1,1E-10                                   | 71                                                           | 3,7E-10                     | 96                                                        | 5,0E-09                                                     | 80                                                         | 3,9E-09                  | 72                                                         |
| H1H20645D          | 8,4E-10                                   | 94                                                           | 5,3E-09                     | 87                                                        | 1,8E-08                                                     | 87                                                         | 1,3E-08                  | 95                                                         |
| H1H20646D          | 1,3E-09                                   | 91                                                           | 5,4E-09                     | 84                                                        | 2,0E-08                                                     | 83                                                         | 1,4E-08                  | 94                                                         |
| H1H20647D          | 9,0E-09                                   | 85                                                           | INC                         | 60                                                        | 3,2E-08                                                     | 80                                                         | 2,5E-08                  | 91                                                         |

| <b>Блокировано &gt;50% в некоторых форматах анализа</b>          |         |     |     |     |         |    |         |    |
|------------------------------------------------------------------|---------|-----|-----|-----|---------|----|---------|----|
| Блокировано >50% на планшете, покрытом hIgG1-k, hIgG2-k, hIgG3-k |         |     |     |     |         |    |         |    |
| H1H20631D                                                        | 8,8E-09 | 78  | INC | 51  | 2,1E-08 | 78 | -       | 38 |
| Блокировано >50% на планшете, покрытом hIgG1-k, hIgG2-k, hIgGM   |         |     |     |     |         |    |         |    |
| H1H20639D                                                        | INC     | 64  | -   | 33  | 7,0E-08 | 82 | 4,2E-08 | 86 |
| H1H20643D                                                        | 7,1E-08 | 78  | -   | 42  | INC     | 70 | 3,3E-08 | 95 |
| H1H20644D                                                        | 2,4E-08 | 66  | -   | 36  | 6,3E-08 | 81 | 4,3E-08 | 75 |
| Блокировано >50% на планшете, покрытом IgG2-k и hIgM             |         |     |     |     |         |    |         |    |
| H1H20637D                                                        | -       | -3  | -   | -2  | 1,0E-07 | 70 | 7,1E-08 | 88 |
| <b>Блокировано &lt;50% во всех форматах анализа</b>              |         |     |     |     |         |    |         |    |
| H1H20636D                                                        | -       | -29 | -   | -11 | -       | 20 | -       | 11 |
| H1H20638D                                                        | -       | -30 | -   | -25 | -       | 33 | -       | 28 |
| H1H20641D                                                        | -       | -17 | -   | -13 | -       | 19 | -       | 14 |
| <b>Антитело для контроля изотипа</b>                             |         |     |     |     |         |    |         |    |
| Антитело для контроля изотипа IgG1 человека                      | -       | 6   | -   | 10  | -       | 30 | -       | 10 |

**[00225]** При наивысшей тестируемой концентрации антитела, пять из семнадцати биспецифических антител против IsdB x против C1q блокировали >50% связывания biot-hC1q только с некоторыми тестируемыми лигандами hC1q. Одно из этих антител (H1H20631D) блокировало связывание 30 пМ biot-hC1Q с hIgG1-k и hIgG3-k, и связывание 6 нМ biot-hC1q с hIgG2-k с значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 8,8 нМ до 21 нМ и % блокирования от 51% до 78%. Это биспецифическое антитело против IsdB x против C1q в концентрации 200 нМ блокировало связывание 6 нМ biot-hC1q с hIgM с % блокирования 67%, но при наивысшей тестируемой концентрации 600 нМ, оно блокировало связывание biot-hC1q с hIgM с % блокирования 38%. Три антитела (H1H20639D, H1H20643D и H1H20644D) блокировали >50% только для связывания 30 пМ biot-C1q с hIgG1-k, и связывания 6 нМ biot-hC1q с hIgG2-k и hIgM с значением  $IC_{50}$  в диапазоне от 24 нМ до 71 нМ и % блокирования от 64% до 95%. Другое антитело (H1H20637D) блокировало >50% только для связывания 6 нМ biot-hC1q с hIgG2-k и hIgM с значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 71 нМ до 100 нМ и % блокирования между 70% и 88%.

**[00226]** Три из семнадцати биспецифических антител против IsdB x против C1q (H1H20636D, H1H20638D, H1H20641D) и не относящееся к делу антитело для контроля изотипа блокировали <50% связывания biot-hC1q с hIgG1-k, hIgG2-k, hIgG3-k и hIgM.

**[00227]** Блокирование связывания C1q человека с антителами посредством биспецифического антитела показывает, что большинство из биспецифических антител, по меньшей мере частично, блокирует связывание C1q с участками на молекулах иммуноглобулинов.

#### **Пример 6 Анализ классического пути гемолиза**

**[00228]** Система комплемента представляет собой группу белков, которая при активации приводит к лизису клетки-мишени и способствует фагоцитозу посредством опсонизации. Компонент комплемента C1q представляет собой белок 410 кДа, который формирует гексамер, содержащий 1 ствол и 6 стеблей/головок. Каждый стебель/головка

содержит три полипептида (А, В, С). Белки C1q А, В, С имеют длину 245, 253 и 245 а.к., соответственно. Каждая цепь имеет N-концевую область, содержащую остаток цистеина, за которым следуют коллагеноподобные области (CLR) и С-конец (область глобулярной головки). C1q формирует комплекс с двумя молекулами C1r и двумя молекулами C1s, обозначенный как комплекс C1.

**[00229]** Комплемент активируется посредством серии стадий протеолиза, активируемых посредством трех главных путей: классического пути (CP), как правило, активируемого посредством иммунных комплексов, альтернативного пути (AP), который может быть индуцирован посредством незащищенных поверхностей клеток, и пути связывающего маннозу лектина (MBL). Классический путь инициируется посредством связывания C1q/r<sub>2</sub>/s<sub>2</sub> с областью Fc IgM и IgG или непосредственно с поверхностью патогена, приводящего к аутоактивации сериновой протеазы C1r, которая активирует сериновую протеазу C1s, которая, в свою очередь, расщепляет/активирует C2 и C4, что затем приводит к расщеплению C3 и C5, в конечном счете приводящему к образованию мембраноатакующего комплекса (MAC) и лизису клетки.

**[00230]** Анализ классического пути (CP) представляет собой анализ скрининга по активации классического пути активации комплемента, который является чувствительным к уменьшению, отсутствию и/или инактивации любого компонента пути. В анализе CP тестируют функциональную способность компонентов комплемента сыворотки из классического пути лизировать эритроциты овцы (SRBC), предварительно покрытые антителом кролика против эритроцитов овцы (гемолизином). Когда покрытые антителом SRBC инкубируют с тестируемой сывороткой, классический путь комплемента активируется и приводит к гемолизу. Если компонент комплемента (например, C1q) отсутствует, процент активности гемолиза составляет ноль; если количество одного или нескольких компонентов классического пути уменьшено, активность CP уменьшается (Giclas PC 1994). Этот анализ используют для характеристики и скрининга антител против IsdB x против C1q.

### **Способы**

**[00231]** Желательное количество SRBC овцы промывали в буфере GVB++ (веронал-желатиновом буфере с Ca и Mg от CompTech) и ресуспендировали при  $1 \times 10^9$  клеток/мл. Для сенсibilизации SRBC, всего  $1 \times 10^9$ /мл клеток SRBC смешивали с равным объемом разведенного 1:50 гемолизина кролика против овцы (1,5 мг/мл) при 37°C в течение 20 минут (конечная концентрация клеток SRBC;  $5 \times 10^8$  клеток/мл и гемолизин при 0,75 мг/мл). Сенсibilизированные SRBC разводили до  $2 \times 10^8$  клеток/мл в буфере GVB++ до использования в анализе гемолиза. Истощенную по C1q человеческую сыворотку разводили от 100% до 4% с использованием буфера GVB++. C1q человека разводили до 312 пМ в буфере GVB++. Тестируемые антитела подготавливали в диапазоне от 83,33 нМ до 0,041 нМ в буфере GVB++.

**[00232]** Всего 75 мкл каждого из тестируемых антител объединяли с 5 мкл C1q человека, до общего объема 80 мкл, где диапазон конечных концентраций антитела

становился от 78,13 нМ до 0,038 нМ, и C1q присутствовал в фиксированной концентрации 19,5 пМ. Тестируемые антитела представляли собой биспецифические антитела: H1H20631D, H1H20632D, H1H20633D, H1H20634D, H1H20635D, H1H20636D, H1H20637D, H1H20638D, H1H20639D, H1H20640D, H1H20641D и H1H20642D. Из этих 80 мкл смеси, 50 мкл затем переносили в новый 96-луночный планшет и смешивали с 50 мкл 4% истощенной по C1q человеческой сыворотки. В общем объеме 100 мкл, конечная концентрация антитела лежала в диапазоне от 39,1 нМ до 0,019 нМ, C1q присутствовал в фиксированной концентрации 9,75 пМ, и истощенная по C1q сыворотка присутствовала в концентрации 2%. Немедленно добавляли 100 мкл сенсibilизированных SRBC (при  $2 \times 10^8$  клеток/мл), до общего объема 200 мкл, и инкубировали в течение 1 час при 37°C. По истечению времени инкубации, клетки осаждали посредством центрифугирования при 1250 x g при 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный плоскодонный планшет и считывали при 412 нм посредством считывателя для микропланшетов Spectramax M5 от Molecular Devices и программного обеспечения SoftMax Pro.

**[00233]** Кроме того, зависимость ответа истощенной по C1q человеческой сыворотки от дозы C1q человека определяли следующим образом. 2х раствор для хранения истощенной по C1q человеческой сыворотки получали посредством разведения сыворотки от 100% до 4% в буфере GVB++. 2х раствор для хранения белка C1q человека разводили от  $6,1 \times 10^{-8}$  М до  $7,2 \times 10^{-15}$  М в буфере GVB++. Всего 50 мкл 2х раствора для хранения истощенной по C1q сыворотки добавляли к 50 мкл 2х раствора для хранения C1q, полученного в диапазоне разведений, до общего объема 100 мкл, где конечная концентрация истощенной по C1q человеческой сыворотки составляла 2%, и конечная концентрация C1q лежала в диапазоне от  $3,05 \times 10^{-8}$  М до  $3,6 \times 10^{-15}$  М. Немедленно добавляли 100 мкл сенсibilизированных SRBC (при  $2 \times 10^8$  клеток/мл), до общего объема 200 мкл, и инкубировали в течение 1 час при 37°C. По истечению времени инкубации, клетки осаждали посредством центрифугирования при 1250 x g при 4°C, и супернатант считывали при 412 нм, как описано выше.

**[00234]** Гемолитическую активность рассчитывали при конечной концентрации сыворотки 2% следующим образом: сначала OD<sub>412</sub> только разбавителя GVB++ (без SRBC) вычитали из всех данных, затем OD<sub>412</sub> для фонового лизиса клеток (т.е. клеток, инкубированных только в буфере GVB++, без сыворотки) вычитали из всех данных. Затем OD<sub>412</sub> всех экспериментальных образцов делили на OD<sub>412</sub> при максимальном лизисе клеток (клеток, обработанных 100 мкл воды) и затем умножали на 100.

**[00235]** Для обобщения, процент гемолиза рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ гемолиза} = 100 \times \frac{(\text{экспериментальный лизис клеток} - \text{фоновый лизис клеток})}{(\text{максимальный лизис клеток} - \text{фоновый лизис клеток})}$$

Результаты, выраженные как % гемолиза, анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистики) с использованием программного

обеспечения Prism 6 (GraphPad) для получения значений  $IC_{50}$ . 0-100% ингибирование гемолиза посредством биспецифических антител или контроля изотипа основано на различии % гемолиза между самой низкой и самой высокой концентрацией антитела, деленном на различие % гемолиза между самой низкой концентрацией антитела и минимумом ответа на дозу C1q, умноженным на 100. Представленные данные представляют собой отдельные точки (повторов не проводили).

**[00236]** Одиннадцать биспецифических антител против IsdB x против C1q по настоящему изобретению тестировали в анализе классического пути (CP) гемолиза. Семь биспецифических антител; H1H20631D, H1H20632D, H1H20633D, H1H20634D, H1H20635D, H1H20640D, H1H20642D сильно блокируют активность CP гемолиза. Одно биспецифическое антитело H1H20637D умеренно блокирует (при наивысшей тестируемой концентрации 40 нМ); и три биспецифических антитела H1H20636D, H1H20638D и H1H20641D не блокируют активность CP гемолиза. (См. таблицу 12 ниже.)

**[00237]** В заключение, 7 из 11 антител по настоящему изобретению блокируют классический путь активации комплемента.

**Таблица 12**

| <b>Биспецифическое антитело против IsdB x против C1q, AbPID</b> | <b>Номер PID против IsdB</b> | <b>Номер PID против C1q</b> | <b><math>IC_{50}</math> (М)</b> | <b>% ингибирования</b> | <b>Заклучение</b>  |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------|
| H1H20631D                                                       | H1H20295P2VH                 | H1xH17736P2VH               | 2,67E-09                        | 100                    | сильно блокирует   |
| H1H20632D                                                       | H1H20295P2VH                 | H1xH17738P2VH               | 1,78E-09                        | 100                    | сильно блокирует   |
| H1H20633D                                                       | H1H20295P2VH                 | H1xH18392P2VH               | 1,42E-09                        | 100                    | сильно блокирует   |
| H1H20634D                                                       | H1H20295P2VH                 | H1xH18394P2VH               | 5,02E-10                        | 100                    | сильно блокирует   |
| H1H20635D                                                       | H1H20295P2VH                 | H1xH18395P2VH               | 8,88E-09                        | 97                     | сильно блокирует   |
| H1H20636D                                                       | H1H20318P2VH                 | H1xH17773P2VH               | не блокирует                    | 0                      | не блокирует       |
| H1H20637D                                                       | H1H20318P2VH                 | H1xH17779P2VH               | неубедительно                   | 50                     | умеренно блокирует |
| H1H20638D                                                       | H1H20318P2VH                 | H1xH17781P2VH               | не блокирует                    | 24                     | не блокирует       |
| H1H20640D                                                       | H1H20318P2VH                 | H1xH17756P2VH               | 4,27E-10                        | 99                     | сильно блокирует   |
| H1H20641D                                                       | H1H20318P2VH                 | H1xH17758P2VH               | не блокирует                    | 0                      | не блокирует       |
| H1H20642D                                                       | H1H20318P2VH                 | H1xH17760P2VH               | 1,06E-10                        | 99                     | сильно блокирует   |
|                                                                 |                              |                             |                                 |                        |                    |
| <b>REGN#</b>                                                    |                              |                             | <b><math>IC_{50}</math> (М)</b> | <b>% ингибирования</b> | <b>Заклучение</b>  |

|          |     |     |              |   |              |
|----------|-----|-----|--------------|---|--------------|
| REGN1932 | n/a | n/a | не блокирует | 0 | не блокирует |
|----------|-----|-----|--------------|---|--------------|

### **Пример 7 Анализ комплементзависимой цитотоксичности**

**[00238]** Классический анализ комплементзависимой цитотоксичности (CDC) разработан для оценки способности биспецифических антител по настоящему изобретению блокировать CDC, опосредованную компонентом комплемента C1q человека (hC1q). Использовали клетки Daudi, линию В-клеток человека, экспрессирующую CD20, антитело против CD20 и нормальную человеческую сыворотку в качестве источника компонентов комплемента. Показано, что терапевтические антитела против CD20, против специфического для В-клеток антигена CD20 поверхности клеток, приводят к CDC для В-клеток (Glennie et al., Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies, Molecular Immunology, Volume 44, Issue 16, September 2007, Pages 3823-3837), и анализ CDC с использованием линий клеток, экспрессирующих CD20, описан ранее (Flieger et al., Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines, Cellular Immunology, Volume 204, Issue 1, August 25 2000, Pages 55-63).

### **Способы**

**[00239]** Для биологического анализа, клетки Daudi рассеивали в 96-луночные планшеты для анализа при 10000 клеток/лунку в RPMI, содержащей 10% инактивированной нагреванием FBS, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин, пируват натрия и заменимые аминокислоты (полной среде RPMI). Для измерения CDC, антитело против CD20 разводили 1:3 от 100 нМ до 2 пМ (включая контрольный образец, не содержащий антител) и инкубировали с клетками в течение 10 минут при 25°C, с последующим добавлением 1,67% человеческой сыворотки с сохраненным комплементом. Для тестирования ингибирования CDC, биспецифические антитела против IsdB x против hC1q, общепринятые антитела против IsdB, антитело против C1q или антитело для контроля изотипа, разводили 1:3 либо от 750 нМ до 13 пМ, либо от 611 нМ до 10 пМ (включая контрольный образец, не содержащий антител) и инкубировали с 1,67% сывороткой в течение 30 минут. За десять минут до добавления антител с сывороткой к клеткам, антитело против CD20 добавляли к клеткам при 2 нМ. По завершении инкубации с антителом против CD20, смесь антител плюс сыворотка добавляли к клеткам. Цитотоксичность измеряли через 3,5 часа инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, с последующей 15-минутной инкубацией при 25°C и последующим анализом реагента CytoTox-Glo™ (Promega, # G9292). CytoTox-Glo™ представляет собой реагент на основе люминесценции, который измеряет уничтожение клеток таким образом, что увеличенную люминесценцию наблюдают при увеличении цитотоксичности (измеренную в относительных световых единицах, RLU). Необработанные клетки в контрольных лунках лизировали посредством обработки 166,7 мкг/мл дигитонина, непосредственно после добавления реагента CytoTox-Glo™, для определения максимального уничтожения

клеток. Планшеты считывали по люминесценции посредством устройства Victor X (Perkin Elmer) через 15 минут после добавления CytoTox-Glo™.

**[00240]** Процент цитотоксичности рассчитывали по значениям RLU с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 \times \frac{(\text{экспериментальный лизис клеток} - \text{фоновый лизис клеток})}{(\text{максимальный лизис клеток} - \text{фоновый лизис клеток})}$$

В этом уравнении, «фоновый лизис клеток» представляет собой люминесценцию для клеток, обработанных только средой и сывороткой без какого-либо антитела против CD20, и «максимальный лизис клеток» представляет собой люминесценцию для клеток, обработанных 166,7 мкг/мл дигитонина. Результаты, выраженные как % цитотоксичности, анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистики) с использованием программного обеспечения Prism 5 (GraphPad) для получения значений EC<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub>. % ингибирования антител рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ ингибирования} = 100 \times \frac{\text{цитотоксичность}_{\text{исходная}} - \text{цитотоксичность}_{\text{ингибирования}}}{(\text{цитотоксичность}_{\text{исходная}} - \text{цитотоксичность}_{\text{фоновая}})}$$

В этом уравнении «цитотоксичность<sub>исходная</sub>» представляет собой % цитотоксичности для клеток, обработанных только 2нМ антителом против CD20, «цитотоксичность<sub>ингибирования</sub>» представляет собой минимальное значение % цитотоксичности для зависимости от дозы конкретного ингибирующего антитела для 2нМ антитела против CD20, и «цитотоксичность<sub>фоновая</sub>» представляет собой % цитотоксичности для клеток без каких-либо антител. В вышеуказанном уравнении, все условия включают 1,67% сыворотки.

**[00241]** Семнадцать биспецифических антител против IsdB x против C1q по настоящему изобретению тестировали по их способности ингибировать C1q в анализе CDC с использованием клеток Daudi с 1,67% человеческой сывороткой и 2нМ антителом против CD20. Как показано в таблице 13, для одиннадцати из 17 биспецифических антител показано по меньшей мере 94% ингибирование опосредованной C1q CDC с значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 нМ до более чем 100 нМ. Пять из оставшихся биспецифических антител блокировали с значениями IC<sub>50</sub> более чем 100 нМ, и максимальным ингибированием (при 750 нМ антителе) в диапазоне от 33% до 88%. Для одного из биспецифических антител (H1H20636D), вместе с общепринятыми антителами против IsdB, содержащими область связывания против IsdB из биспецифических антител, не показано ингибирование опосредованной hC1q CDC. Для антитела для контроля изотипа IgG1 человека, контрольного mAb1, также не показано значительного ингибирования CDC. Для коммерческого моноклонального антитела против C1q (Quidel, A201) показано >99% ингибирование CDC с значением IC<sub>50</sub> 3,0 нМ. Для антитела против CD20 показана CDC для клеток Daudi с 1,67% человеческой сывороткой с значением EC<sub>50</sub> 892 пМ и максимальным % цитотоксичности при 100 нМ 62%.



**Таблица 13:** Ингибирование посредством биспецифического антитела против IsdB х против C1q CDC для клеток Daudi с 1,67% человеческой сывороткой и 2нМ антителом против CD20:

| <b>Биспецифическое антитело против IsdB х против C1q</b> | <b>IC50 [M] (макс. % ингибирования)*</b> |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>H1H20631D</b>                                         | <b>&gt; 1,0E-07 (94%)</b>                |
| <b>H1H20632D</b>                                         | <b>2,3E-07</b>                           |
| <b>H1H20633D</b>                                         | <b>1,7E-08</b>                           |
| <b>H1H20634D</b>                                         | <b>1,9E-08</b>                           |
| <b>H1H20635D</b>                                         | <b>2,8E-08</b>                           |
| <b>H1H20636D</b>                                         | <b>Отсутствие ингибирования</b>          |
| <b>H1H20637D</b>                                         | <b>&gt; 1,0E-07 (67%)</b>                |
| <b>H1H20638D</b>                                         | <b>1,0E-07</b>                           |
| <b>H1H20639D</b>                                         | <b>&gt; 1,0E-07 (70%)</b>                |
| <b>H1H20640D</b>                                         | <b>1,1E-08</b>                           |
| <b>H1H20641D</b>                                         | <b>&gt; 1,0E-06 (33%)</b>                |
| <b>H1H20642D</b>                                         | <b>1,0E-08</b>                           |
| <b>H1H20643D</b>                                         | <b>3,7E-08</b>                           |
| <b>H1H20644D</b>                                         | <b>&gt; 1,0E-07 (88%)</b>                |
| <b>H1H20645D</b>                                         | <b>3,4E-08</b>                           |
| <b>H1H20646D</b>                                         | <b>5,4E-08</b>                           |
| <b>H1H20647D</b>                                         | <b>&gt; 1,0E-07 (82%)</b>                |
| <b>H1H20295P2(против IsdB)</b>                           | <b>Отсутствие ингибирования</b>          |
| <b>H1H20318P2(против IsdB)</b>                           | <b>Отсутствие ингибирования</b>          |
| <b>против C1q (Quidel, A201)</b>                         | <b>3,0E-09</b>                           |
| <b>Контрольное mAb1</b>                                  | <b>Отсутствие ингибирования</b>          |

\*Если не указано иное, все ингибирование составляет  $\geq 99\%$

**Пример 8 А: Связывание биспецифических антител против IsdB х против C1q с S. aureus Wood 46**

**[00242]** Связывание биспецифических антител против IsdB х против C1q с IsdB, экспрессированным на поверхности S. aureus, определяли в формате на основе ELISA. Чтобы отличать связывание с IsdB от неспецифического связывания антитела с белком А, экспрессированным S. aureus (Lindmark et. al, J Immunol Methods, 1983 Aug 12;62(1):1-13), штамм бактерии с недостаточностью белка А, S. aureus Wood 46, использовали в анализе.

**Способы**

**[00243]** Биспецифические антитела против IsdB х против C1q по этому изобретению (H1H20631D, H1H20632D, H1H20633D, H1H20634D, H1H20635D, H1H20636D, H1H20637D, H1H20638D, H1H20639D, H1H20640D, H1H20641D, H1H20642D, H1H20643D, H1H20644D, H1H20645D, H1H20646D, H1H20647D) тестировали по связыванию с S. aureus Wood 46 посредством ELISA. Кратко, S. aureus Wood 46 выращивали в RPMI в течение ночи, промывали в PBS и довели до OD<sub>600</sub> 0,25. 96-луночные микропланшеты для титрования MaxiSorp покрывали в течение ночи с использованием 100 мкл культуры S. aureus на лунку. Планшеты промывали и блокировали с использованием 3% BSA. Растворы в диапазоне 0,14 нМ - 0,1 мкМ с использованием разведений 1:3 биспецифических антител против IsdB х против C1q,

контроля I, контроля II контроля III и антитела для отрицательного контроля изотипа добавляли в содержащие *S. aureus* лунки и инкубировали в течение 1 часа при 25°C. Вторичное антитело против антител человека, конъюгированное с HRP, добавляли в промытые планшеты. Затем реагенты для люминесценции (SuperSignal Pico) добавляли в лунки, и сигнал детектировали в считывателе для планшетов (считывателе для планшетов Victor X3, Perkin Elmer) немедленно. Значения люминесценции анализировали посредством четырех- параметрического логистического уравнения на протяжении 7- точечной кривой ответа (GraphPad Prism) для определения EC<sub>50</sub> связывания антител.

**[00244]** Контрольные антитела, использованные в этом исследовании (пример 8A и 8B) включают следующие: контроль I представляет собой антитело hIgG1 против IsdB, описанное в US2010/0166772 и обозначенное CS-D7 (См. также SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 в US2010/0166772). Контроль II представляет собой двухвалентное антитело, специфическое для IsdB, полученное, как описано в настоящем описании (пример 2, таблица 3): антитело H1H20295P2 и пара HCVR/LCVR, имеющая аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:138/146. Контроль III представляет собой двухвалентное антитело, специфическое для IsdB, полученное, как описано в настоящем описании (пример 2, таблица 3): H1H20318P2 и пара HCVR/LCVR, имеющая аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:154/162. Антитела контроль II и контроль III не имеют антигенсвязывающего домена, который связывается с C1q. REGN1932 представляет собой антитело для отрицательного контроля изотипа, специфическое для антигена, отличного от IsdB или C1q.

#### **Результаты:**

**[00245]** При анализе по их способности связывать *S. aureus* Wood 46 посредством ELISA, для антител, описанных по этому изобретению, показана аффинность связывания в диапазоне от  $1,04 \times 10^{-9}$  М до  $1,8 \times 10^{-8}$  М, в то время как для контроля I-III показана аффинность связывания в диапазоне от  $9,13 \times 10^{-11}$  М до  $3,6 \times 10^{-9}$  М. Антитело для отрицательного контроля изотипа не связывало *S. aureus* Wood 46 (таблица 14).

#### **Пример 8B: Зависимое от биспецифических антител против IsdB x против C1q накопление компонента комплемента C1q на *S. aureus* Cowan I**

**[00246]** Накопление C1q, стимулированное биспецифическими антителами против IsdB x против C1q, на поверхности штамма *S. aureus* Cowan I определяли в формате на основе ELISA посредством прямого измерения C1q, накопленного из человеческой сыворотки, на поверхности патогена, опосредованного биспецифическими антителами.

#### **Способы**

**[00247]** Биспецифические антитела против IsdB x против C1q по этому изобретению (H1H20631D, H1H20632D, H1H20633D, H1H20634D, H1H20635D, H1H20636D, H1H20637D, H1H20638D, H1H20639D, H1H20640D, H1H20641D, H1H20642D, H1H20643D, H1H20644D, H1H20645D, H1H20646D, H1H20647D) тестировали по накоплению комплемента на *S. aureus* Cowan I в формате анализа на основе ELISA. Кратко, *S. aureus* Cowan I выращивали в RPMI в течение ночи, промывали

в PBS и доводили до OD<sub>600</sub> 0,25. 96-луночные микропланшеты для титрования MaxiSorp покрывали в течение ночи с использованием 100 мкл культуры *S. aureus* на лунку. Планшеты фиксировали с использованием 2% параформальдегида и блокировали с использованием 3% BSA перед добавлением раститровок в диапазоне 0,14 нМ - 0,1 мкМ с использованием разведений 1:3 биспецифических антител против IsdB х против C1q, контроля I, контроля II, контроля III и антител для контроля изотипа в течение 1 часа при 25°C. После промывки, 5% истощенной по C1q посредством адсорбции на белке A/G сыворотки, дополненной 60 мкг/мл очищенного C1q человека добавляли на 1,5 часа при 37°C. Антитело козы против C1q добавляли для детекции накопления C1q, за этим следовало вторичное антитело осла против антител козы с HRP. Планшеты промывали в промывателе для планшетов между каждым стадиями. Затем реагенты для люминесценции (SuperSignal Pico) добавляли в лунки, и сигнал детектировали в считывателе для планшетов (считывателе для планшетов Victor X3, Perkin Elmer). Значения люминесценции анализировали посредством четырех- параметрического логистического уравнения на протяжении 7-точечной кривой ответа (GraphPad Prism) для расчета EC<sub>50</sub> связывания антител.

### Результаты

**[00248]** При анализе их способности стимулировать накопление C1q на *S. aureus* Cowan I, для всех антител по изобретению показаны значения EC<sub>50</sub> в диапазоне от  $3,76 \times 10^{-12}$  М до  $8,54 \times 10^{-9}$  М, в то время как измерение не показало накопления по C1q для контроля I-III и отрицательного контроля изотипа (таблица 14).

**Таблица 14: Связывание биспецифических антител против IsdB х против C1q с *S. aureus* Wood 46 и накопление компонента комплемента C1q на *S. aureus* Cowan I**

| ID антитела | Описание                                 | Связывание с <i>S. aureus</i> Wood 46, EC50 (M) | Накопление C1q на <i>S. aureus</i> Cowan I, EC50 (M) |
|-------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| H1H20631D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,263E-09                                       | 2,971E-10                                            |
| H1H20632D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,08E-09                                        | 5,294E-10                                            |
| H1H20633D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,307E-09                                       | 2,035E-10                                            |
| H1H20634D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,038E-09                                       | Выше диапазона анализа                               |
| H1H20635D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,958E-09                                       | 4,251E-10                                            |
| H1H20636D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 9,521E-09                                       | 8,539E-09                                            |
| H1H20637D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,129E-08                                       | 5,005E-09                                            |
| H1H20638D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,039E-08                                       | 2,546E-09                                            |
| H1H20639D   | биспецифическое против IsdB х против C1q | 1,332E-08                                       | 2,064E-09                                            |

|                             |                                          |                       |                       |
|-----------------------------|------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| H1H20640D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 1,802E-08             | 3,762E-12             |
| H1H20641D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 1,035E-08             | 1,291E-09             |
| H1H20642D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 8,572E-09             | 5,858E-12             |
| H1H20643D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 1,006E-08             | 1,779E-09             |
| H1H20644D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 1,258E-08             | 1,116E-09             |
| H1H20645D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 1,186E-08             | 2,978E-10             |
| H1H20646D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 1,294E-08             | 4,158E-10             |
| H1H20647D                   | биспецифическое против IsdB x против C1q | 7,3E-09               | 5,874E-10             |
| Контроль I (REGN3457)       | hIgG1 против IsdB (COMP)                 | 9,127E-11             | Отсутствие накопления |
| Контроль изотипа (REGN1932) | контроль изотипа IgG1                    | Отсутствие связывания | Отсутствие накопления |
| Контроль II (H1H20295P2)    | двухвалентное hIgG1 против IsdB          | 6,464E-10             | Отсутствие накопления |
| Контроль III (H1H20318P2)   | двухвалентное hIgG1 против IsdB          | 3,601E-09             | Отсутствие накопления |

**Пример 9А Функциональный анализ: Выживаемость бактерий в цельной крови: выживаемость *S. aureus* в цельной крови человека и эффекты антитела против IsdB x против C1q**

[00249] Выживаемость *S. aureus* в цельной крови человека можно оценивать в анализе *ex vivo* для исследования роли комплемента и иммуноэффекторных клеток в модуляции роста бактерий (J Exp Med. 2009 Oct26;206(11):2417-27). Активность биспецифических антител против IsdB x против C1q в модуляции выживаемости *S. aureus* измеряют в этом анализе, когда биспецифические антитела или контрольные антитела добавляют в цельную кровь, и выживаемость оценивают через 24 часа.

**Способы**

[00250] Биспецифические антитела против IsdB x против C1q по этому изобретению (H1H20631D, H1H20632D, H1H20633D, H1H20634D, H1H20635D, H1H20636D, H1H20637D, H1H20638D, H1H20639D, H1H20640D, H1H20641D, H1H20642D, H1H20643D, H1H20644D, H1H20645D, H1H20646D, H1H20647D) оценивали по бактерицидной активности против *S. aureus* Newman в анализе выживаемости *S. aureus* в цельной крови. Кратко, культуру *S. aureus* Newman выращивали в RPMI в течение ночи, промывали в PBS, и ресуспендировали до концентрации  $1 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл в PBS. В двух повторях, 10 мкл суспензии *S. aureus*, предварительно смешанной с 10 мкг/мл тестируемых и контрольных антител в течение 10 минут,

добавляли к 100 мкл цельной крови человека (в цитрате натрия в качестве антикоагулянта с дополнительным 500 нМ дабигатрана для предотвращения формирования сгустка). Образцы инкубировали в 96-луночных планшетах при 37°C с встряхиванием (100 об./мин) в течение 24 часов. После инкубации, 100 мкл буфера для лизиса-агглютинации (PBS, дополненного 200 ед. стрептокиназы, 2 мкг/мл РНКазы, 10 мкг/мл ДНКазы, 0,5% сапонины, 100 мкг трипсина на мл PBS) добавляли к образцам и интенсивно встряхивали до исчезновения осадка. Всего 50 мкл из каждого образца серийно разводили в PBS и рассеивали на чашки с LB с агаром для подсчета КОЕ.

**[00251]** Контрольные антитела, использованные в этом анализе (пример 9А и 9В), включают следующие: контроль I представляет собой антитело hIgG1 против IsdB, описанное в US2010/0166772 и обозначенное CS-D7 (См. также SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 в US2010/0166772). Контроль II представляет собой двухвалентное антитело, специфическое для IsdB, полученное, как описано в настоящем описании (пример 2, таблица 3): антитело H1H20295P2 и пара HCVR/LCVR, имеющая аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:138/146. Контроль III представляет собой двухвалентное антитело, специфическое для IsdB, полученное, как описано в настоящем описании (пример 2, таблица 3): H1H20318P2 и пара HCVR/LCVR, имеющая аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:154/162. Антитела контроль II и контроль III не имеют антигенсвязывающего домена, который связывается с C1q. REGN1932 представляет собой антитело для отрицательного контроля изотипа, специфическое для антигена, отличного от IsdB или C1q.

### Результаты

**[00252]** Результаты двух независимых экспериментов представлены как процент выживаемости *S. aureus* после обработки биспецифическими или контрольными антителами, описаны в настоящем описании и обобщены в таблице 15. Общий рост в цельной крови человека в отсутствие тестируемого антитела нормализован как 100%. Выживаемость *S. aureus* в контрольных антителах и антителах для отрицательного контроля изотипа не поддавалась влиянию и лежала в диапазоне 96-100%, в то время как H1H20631D приводило к 29-42% выживаемости, и H1H20635D приводило к 35-42% выживаемости. H1H20634D оказывало более умеренные эффекты и приводило к 73-76% выживаемости. Остальные биспецифические антитела не изменяли выживаемость *S. aureus*.

**Таблица 15: Выживаемость *S. aureus* Newman в цельной крови человека после обработки биспецифическим антителом против IsdB x против C1q**

| Антитело                        | Эксперимент 1                                                                                             | Эксперимент 2 |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|                                 | % выживаемости <i>S. aureus</i> , по сравнению с цельной кровью (без обработки, нормализованной как 100%) |               |
| Кровь+S. aureus (без обработки) | 100                                                                                                       | 100           |

|                             |     |     |
|-----------------------------|-----|-----|
| Контроль изотипа (REGN1932) | 99  | 100 |
| Контроль I (REGN3457)       | 97  | 101 |
| Контроль II (H1H20295P2)    | 99  | 97  |
| Контроль III (H1H20318P2)   | 96  | 97  |
| H1H20631D                   | 29  | 42  |
| H1H20632D                   | 104 | 98  |
| H1H20633D                   | 101 | 90  |
| H1H20634D                   | 76  | 73  |
| H1H20635D                   | 35  | 42  |
| H1H20636D                   | 108 | 95  |
| H1H20637D                   | 101 | 101 |
| H1H20638D                   | 100 | 97  |
| H1H20639D                   | 97  | 98  |
| H1H20640D                   | 100 | 97  |
| H1H20641D                   | 95  | 97  |
| H1H20642D                   | 100 | 95  |
| H1H20643D                   | 99  | 96  |
| H1H20644D                   | 101 | 87  |
| H1H20645D                   | 102 | 90  |
| H1H20646D                   | 98  | 100 |
| H1H20647D                   | 97  | 99  |

**Пример 9В. выживаемость *S. aureus* в цельной крови человека в присутствии блокирующего C5 антитела и цитохалазина D**

[00253] Для определения механизма действия биспецифического антитела против IsdB х против C1q, использовали анализ выживаемости *S. aureus* в цельной крови, описанный выше. Блокирующее C5 антитело использовали для определения того, являлось ли уменьшение выживаемости результатом опсонизации посредством продуктов расщепления C4 или C3, приводящей к увеличенному поглощению иммуноэффекторными клетками, или действия мембраноатакующего комплекса (ниже C5). Цитохалазин D блокирует полимеризацию актина и таким образом, предотвращает поглощение патогена иммуноэффекторными клетками.

**Способы**

[00254] Эксперимент проводили, как описано выше, со следующими дополнениями. Часть крови предварительно обрабатывали 40 мкМ цитохалазином D или 5 мкМ блокирующим C5 Fab, или 5 мкМ контрольным Fab в течение 10 минут при комнатной температуре перед добавлением *S. aureus*. За исключением контрольных (без

обработки антителом) условий, когда *S. aureus* предварительно инкубировали с PBS, *S. aureus* предварительно инкубировали с 100 мкг/мл H1H20631D в течение 10 минут, перед добавлением необработанной, обработанной блокирующим C5 Fab, обработанной контрольным Fab или обработанной цитохалазином D цельной крови человека. Как выше, образцы инкубировали в 96-луночных планшетах при 37°C с встряхиванием (100 об./мин) в течение 24 часов. После инкубации, 100 мкл буфера для лизиса-агглютинации добавляли для растворения сгустка крови, и выжившие бактерии рассеивали на чашки с LB с агаром для определения КОЕ.

### Результаты

[00255] Через 24 часа, только 7% бактерий выживали после обработки H1H20631D, по сравнению с контролем без антител. Добавление блокирующего компонент комплемента белок 5; C5, Fab увеличивало выживаемость до 91%; контрольное Fab не создавало помех для активности H1H20631D для уменьшения выживаемости бактерий (5%). Однако, блокирование фагоцитарной активности лейкоцитов с использованием цитохалазина D посредством ингибирования полимеризации актина, существенно не улучшало выживаемость *S. aureus* (12%). Совместно, эти данные позволяют предполагать, что активность биспецифических антител против IsdB x против C1q проявляется в первую очередь ниже C5, особенно в отношении литической активности мембраноатакующего комплекса. Данные выживаемости обобщены в таблице 16.

**Таблица 16: Выживаемость *S. aureus* в цельной крови человека при обработке биспецифическим антителом против IsdB x против C1q в присутствии блокирующего C5 антитела или цитохалазина D**

| Обработка антителом          | % выживаемости <i>S. aureus</i> |
|------------------------------|---------------------------------|
| Без антитела                 | 100                             |
| H1H20631D                    | 7                               |
| H1H20631D+блокирующий C5 Fab | 91                              |
| H1H20631D+контрольный Fab    | 5                               |
| H1H20631D+цитохалазин D      | 12                              |

**Пример 10** Определение биологической активности антител против IsdB x против C1q в модели бактериемии *S. aureus* на мышах

[00256] *S. aureus* является основной причиной бактериемии у пациентов, и эти инфекции часто являются летальными. Модели бактериемии на мышах разработаны во многих лабораториях с использованием множества лабораторно адаптированных и клинических изолятов *S. aureus*, и на множестве вариантов генетического фона мыши (O'Keefe KM, et al, Infect Immun. 2015 Sep;83(9):3445-57. Manipulation of Autophagy in Phagocytes Facilitates Staphylococcus aureus Bloodstream Infection.; Rauch et al, Infect Immun. 2012 Oct;80(10):3721-32. Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of Staphylococcus aureus peritoneal infection.), для исследования динамики инфекции и эффекта потенциальных терапевтических средств. Модель бактериемии

разработана для оценки активности биспецифических антител против IsdB x против C1q, против *S. aureus*, как для уменьшения бактериальной нагрузки, так и для улучшения выживаемости.

### **Способы**

**[00257]** Мышей с гуманизированным C1q (C1q<sup>Hu/Hu</sup>) получали с использованием человеческих последовательностей для доменов глобулярной головки C1q - C1QA, C1QB и C1QC, вместе с перекрывающимися мышинными последовательностями, которыми заменяют мышинные последовательности C1q на смешанном генетическом фоне линий мышей (High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659). Полученные мыши экспрессируют химерный белок C1q с человеческой головкой, мышинным стеблем и мышинным стволом. Мышей C1q<sup>Hu/Hu</sup> инфицировали внутрибрюшинно с использованием  $1,7 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на мышь в объеме 200 мкл штамма *S. aureus* Newman, выращенного до логарифмической фазы,  $OD_{600} \leq 1$ , в TSB при 37°C и промытого 3 раза в PBS. Немедленно после инфекции, мышам вводили дозы 100 мкг каждого индивидуального антитела, контроля II или совпадающего по изотипу антитела в объеме 100 мкл, внутрибрюшинно. Мышей взвешивали ежедневно до суток 3 после инфекции и регистрировали изменения массы. Мышей подвергали эвтаназии на сутки 3, и почки собирали для определения нагрузки на орган. Кратко, почки гомогенизировали в 5,0 мл PBS с использованием устройства gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec) с использованием программы-E. Гомогенат тканей разводили в PBS, и кратные 10-кратные серийные разведения рассеивали на чашки с LB с агаром и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующие сутки индивидуальные колонии подсчитывали для определения бактериальной нагрузки в этой временной точке после инфекции, и результаты регистрировали как КОЕ/грамм ткани.

**[00258]** Для исследования эффекта биспецифических антител против IsdB x против C1q на выживаемость, мышей инфицировали с использованием  $1,5 \times 10^8$  КОЕ на мышь *S. aureus* Newman и обрабатывали тестируемыми антителами, как описано выше. Контроль представлял собой (отрицательный) контроль изотипа и контроль II: двухвалентное антитело, специфическое для IsdB, полученное, как описано в настоящем описании (пример 2, таблица 3): антитело H1H20295P2 и пара HCVR/LCVR, имеющая аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:138/146. Вместо умерщвления мышей на сутки 3, их мониторовали до суток 18. Мышей, потерявших 20% от их исходной массы тела, умерщвляли и регистрировали как смерть. Процент выживших животных регистрировали в конце исследования.

### **Результаты и заключения:**

**[00259]** Биспецифические антитела против IsdB x против C1q, H1H20631D, H1H20633D, H1H20635D и H1H20636D тестировали параллельно с контрольным антителом и антителом для контроля изотипа по эффективности для уменьшения нагрузки на почки у самок мышей C1q<sup>Hu/Hu</sup> (n=5). По сравнению с контролем инфекции или



мышами после обработки только антителом для контроля изотипа, где  $9 \log$  КОЕ *S. aureus* выделено из почек на сутки 3, наблюдали 4  $\log$  уменьшение общего количества КОЕ после обработки Н1Н20631D и 2  $\log$  уменьшение КОЕ после обработки Н1Н20635D. (См. таблицу 17) Два биспецифических антитела Н1Н20633D и Н1Н20636D не оказывали поддающихся измерению эффектов на бактериальную нагрузку почек.

**Таблица 17:** *S. aureus* Newman в почках на сутки 3 обработки с использованием 5мг/кг антитела против IsdB x против C1q

| AbPID                  | КОЕ/г почки | SD       | Мыши (n) |
|------------------------|-------------|----------|----------|
| Н1Н20631D              | 1,61E+05    | 2,61E+05 | 4        |
| Н1Н20633D              | 3,38E+08    | 2,53E+08 | 4        |
| Н1Н20635D              | 4,18E+07    | 6,82E+07 | 4        |
| Н1Н20636D              | 3,41E+08    | 1,61E+08 | 4        |
| Контроль II            | 3,83E+08    | 1,86E+08 | 5        |
| Контроль изотипа       | 1,11E+09    | 1,15E+09 | 2        |
| Ложная обработка (PBS) | 1,42E+09    | 5,06E+07 | 3        |

**[00260]** Как показано в таблице 18, от суток 1 до суток 3, регистрировали увеличение массы на 8,5% у мышей после обработки с использованием Н1Н20631D и увеличение массы на 7,9% у мышей после обработки с использованием Н1Н20635D. Мыши во всех других тестируемых группах либо сохраняли потерю массы, либо имели очень умеренное увеличение (после обработки отрицательным контролем изотипа и Н1Н20633D).

**Таблица 18:** Изменение массы у мышей на сутки 1-3 после обработки с использованием 5мг/кг биспецифических антител против IsdB x против C1q

| AbPID                  | % изменения массы на сутки 1 | % изменения массы на сутки 2 | % изменения массы на сутки 3 |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Н1Н20631D              | -17,0                        | -13,3                        | -8,9                         |
| Н1Н20633D              | -16,4                        | -14,3                        | -13,8                        |
| Н1Н20635D              | -15,6                        | -13,3                        | -7,7                         |
| Н1Н20636D              | -15,4                        | -17,1                        | -16,5                        |
| Контроль II            | -16,5                        | -18,2                        | -16,0                        |
| Контроль изотипа       | -17,4                        | -16,0                        | -16,2                        |
| Ложная обработка (PBS) | -13                          | -12,8                        | -13                          |

**[00261]** Биспецифическое антитело против IsdB x против C1q, Н1Н20631D, тестировали, вместе с контрольным антителом и антителом для отрицательного контроля изотипа, по эффективности в исследовании выживаемости у самок мышей C1q<sup>Hu/Hu</sup> (n=9). Как показано в таблице 19, в конце исследования, на сутки 18 после инфекции, 100% мышей после обработки Н1Н20631D выжили, по сравнению с 56% мышей после контрольной или ложной обработки и 78% мышей после обработки отрицательным контролем изотипа.

**[00262]** В совокупности, антитела против IsdB x против C1q по настоящему изобретению являются эффективными для уменьшения бактериальной нагрузки на почки

и улучшения выживаемости в линии мышей с гуманизированным C1q в модели бактериемии *S. aureus*.

**Таблица 19:** Выживаемость у мышей после обработки с использованием 5 мг/кг биспецифического антитела против IsdB x против C1q

| AbPID                  | Выживаемость на D18 после инфекции (%) | Мыши (n) |
|------------------------|----------------------------------------|----------|
| H1H20631D              | 100                                    | 9        |
| Контроль II            | 56                                     | 9        |
| Контроль изотипа       | 78                                     | 9        |
| Ложная обработка (PBS) | 56                                     | 9        |

**Пример 11.** Перекрестная конкуренция за C1q биспецифических mAb против IsdB x против C1q

**[00263]** Биспецифические антитела против IsdB x против C1q, описанные в настоящем описании, тестировали по перекрестной конкуренции с использованием безмаркерного анализа интерферометрии биослоя (BLI) с детекцией в реальном времени на биосенсоре Octet HTX. Анализ перекрестной конкуренции обеспечивает определение биспецифических антител, конкурирующих друг с другом за связывание с C1q человека.

**[00264]** Конкуренцию между биспецифическими антителами против IsdB x против C1q за связывание с hC1q (Quidel) определяли с использованием безмаркерного анализа интерферометрии биослоя (BLI) с детекцией в реальном времени на биосенсоре Octet HTX (ForteBio/Pall Life Sciences). Эксперименты проводили при 25°C в буфере, содержащем 0,01M HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, 1,0 мг/мл BSA (буфер HBS-ET от Octet), при встряхивании планшета со скоростью 1000 об./мин. Для оценки того, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на C1q человека, биспецифические антитела против IsdB x против C1q (обозначенные mAb-1) сначала связывали с покрытыми антителом против hFc биосенсорами Octet (ForteBio Inc, #18-5060) посредством погружения биосенсоров в лунки, содержащие раствор 10 мкг/мл биспецифического антитела против IsdBxC1q, в течение 3 минут. Избыточные свободные участки против hFc на покрытых mAb-1 наконечниках сенсора насыщали с использованием антитела для контроля изотипа H1H посредством погружения в лунки, содержащие раствор 200 мкг/мл блокирующего антитела (обозначенного блокирующим mAb), в течение 4 минут. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие раствор совместного комплекса C1q А человека (10 мкг/мл) и приблизительно 10-кратного молярного избытка второго биспецифического mAb против IsdB x против C1q (обозначенного mAb-2) в течение 10 минут.

**[00265]** Все наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-ET Octet между каждым этапом эксперимента. Ответ связывания мониторируют в реальном времени в ходе эксперимента, и ответ связывания в конце каждой стадии регистрировали. Ответы связывания предварительно сформированных комплексов C1q с mAb-2 со связанным

mAb-1 корректировали по фоновому связыванию, сравнивали и конкурентное/неконкурентное поведение определяли для всех 17 биспецифических антител против IsdB x против C1q.

### Результаты и заключение

**[00266]** В таблице 20 показаны взаимосвязи антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания. Четыре биспецифических антитела против IsdB x против C1q (H1H20633D, H1H20635D, H1H20636D, H1H20641D) не проявляли перекрестную конкуренцию ни с одним из других антител, исследуемых в этом исследовании. Антитело H1H20631 являлось эффективным биспецифическим антителом в анализах *in vitro* и *in vivo* для уменьшения бактериальной нагрузки и увеличения выживаемости. Антитело H1H20631 проявляло перекрестную конкуренцию с антителом H1H20638D.

**Таблица 20**

|   | Первое mAb (mAb-1), связанное с использованием биосенсоров АНС Octet | Антитела mAb-2, как показано, конкурирующие с mAb-1 |
|---|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1 | <b>H1H20645D</b>                                                     | <b>H1H20643D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20645D</b>                                    |
| 2 | <b>H1H20643D</b>                                                     | <b>H1H20645D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20646D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20640D</b>                                    |
| 3 | <b>H1H20646D</b>                                                     | <b>H1H20645D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20643D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20640D</b>                                    |
| 4 | <b>H1H20640D</b>                                                     | <b>H1H20643D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20646D</b>                                    |
| 5 | <b>H1H20634D</b>                                                     | <b>H1H20647D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20644D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20639D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20637D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20632D</b>                                    |
| 6 | <b>H1H20647D</b>                                                     | <b>H1H20634D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20644D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20639D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20637D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20642D</b>                                    |
| 7 | <b>H1H20644D</b>                                                     | <b>H1H20634D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20647D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20639D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20637D</b>                                    |
|   |                                                                      | <b>H1H20642D</b>                                    |

|    |           |           |
|----|-----------|-----------|
| 8  | H1H20639D | H1H20634D |
|    |           | H1H20647D |
|    |           | H1H20644D |
|    |           | H1H20637D |
|    |           | H1H20642D |
| 9  | H1H20637D | H1H20634D |
|    |           | H1H20647D |
|    |           | H1H20644D |
|    |           | H1H20639D |
| 10 | H1H20642D | H1H20647D |
|    |           | H1H20644D |
|    |           | H1H20639D |
|    |           | H1H20632D |
| 11 | H1H20632D | H1H20634D |
|    |           | H1H20642D |
|    |           | H1H20638D |
| 12 | H1H20638D | H1H20632D |
|    |           | H1H20631D |
| 13 | H1H20631D | H1H20638D |

**Пример 12. Определение биологической активности антител против IsdB x против C1q в модели бактериемии S. aureus MRSA на мышах**

**[00267]** Для исследования динамики инфекции S. aureus и эффекта потенциальных терапевтических средств, разработана модель бактериемии с использованием устойчивого к метициллину штамма S. aureus (MRSA). Два различных штамма MRSA использовали в этих экспериментах, использовали штамм USA400 MRSA, MW2 (ATCC, кат. No. BAA-1707, номер партии 58910673), так же как штамм USA300 MRSA, CA127 (NARSA, кат. No. NRS643). Штамм S. aureus Newman (чувствительный к метициллину клинический изолят, (MSSA)) также использовали в этих исследованиях. Эту модель использовали для оценки активности биспецифических антител против IsdB x против C1q, против S. aureus для уменьшения бактериальной нагрузки.

**Экспериментальный способ:**

**[00268]** Мышей с гуманизированным C1q ( $C1q^{Hu/Hu}$ ) инфицировали внутрибрюшинно с использованием либо  $1,5 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на мышь штамма S. aureus Newman в объеме 200 мкл, либо  $1,4 \times 10^8$  КОЕ на мышь штамма MRSA, обозначенного MW2, в объеме 200 мкл, либо  $1,4 \times 10^8$  КОЕ на мышь другого штамма MRSA, обозначенного CA127, в объеме 200 мкл. Все три штамма S. aureus выращивали до логарифмической фазы,  $OD_{600} \leq 1$ , в триптическом соевом бульоне (TSB) при 37°C и промывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере (PBS), и доводили до желательной плотности для инфекции. Через двадцать четыре (24) часа после инфекции (сутки 1), мышам вводили дозы внутрибрюшинно 100 мкг биспецифического антитела

против IsdB x против C1q, обозначенного H1H20631D (См. в таблице 6 идентификаторы аминокислотной последовательности), или 100 мкг контрольного антитела II, обозначенного H1H20295P2, или PBS в объеме 100 мкл. Как ранее отмечено в настоящем описании, контроль II представляет собой двухвалентное антитело, специфическое для IsdB, полученное, как описано в примере 2, таблице 3, и содержит аминокислотные последовательности HCVR/LCVR из SEQ ID NO:138/146. Мышей взвешивали ежедневно до суток 4 после инфекции и регистрировали изменения массы. Мышей подвергали эвтаназии на сутки 4, и почки собирали для определения бактериальной нагрузки на орган. Кратко, почки гомогенизировали в 5 мл PBS с использованием устройства gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec) с использованием программы-E, и затем гомогенат разводили в PBS, и кратные 10-кратные серийные разведения рассеивали на чашки с LB с агаром и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующие сутки индивидуальные колонии подсчитывали для определения бактериальной нагрузки, и результаты регистрировали как КОЕ/грамм ткани.

#### **Обобщение результатов и заключения:**

**[00269]** Биспецифическое антитело против IsdB x против C1q, обозначенное H1H20631D, тестировали параллельно с контрольным антителом по эффективности для облегчения нагрузки на почки в линии мышей с гуманизированным C1q (n=5). По сравнению с мышами после обработки антителом для контроля изотипа (контролем II, описанным выше), где 7 log КОЕ *S. aureus* MRSA (MW2 и CA127) выделено из почек на сутки 4, наблюдали уменьшение на 2-4 log общего количества КОЕ после обработки биспецифическим антителом IsdB X C1q, H1H20631D.

**[00270]** В совокупности, биспецифическое антитело против IsdB x против C1q является эффективным для уменьшения бактериальной нагрузки на почки в линии мышей с гуманизированным C1q при бактериемии *S. aureus* MSSA и MRSA.

#### **Обобщение данных в таблице:**

**[00271]** В таблице 21 ниже показана нагрузка *S. aureus* на почки через 3 суток после обработки с использованием 5 мг/кг биспецифического антитела против IsdB x против C1q и контрольного антитела.

**Таблица 21**

| Обработка<br>AbPID (100<br>мкг/мышь) | Бактериальный<br>штамм | КОЕ/г почки | SD       | Мыши (n) | Мыши, выжившие на<br>время обработки на<br>сутки 1 (n) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|----------|----------|--------------------------------------------------------|
| Нет                                  | Newman                 | 4,86E+07    | 4,96E+08 | 5        | 5                                                      |
| Контроль II                          | Newman                 | 3,54E+07    | 1,09E+09 | 5        | 5                                                      |
| H1H20631D                            | Newman                 | 5,54E+05    | 8,34E+05 | 5        | 5                                                      |
| Контроль II                          | MW2                    | 2,04E+07    | 1,55E+07 | 5        | 3                                                      |
| H1H20631D                            | MW2                    | 1,09E+05    | 3,92E+04 | 5        | 2                                                      |
| Контроль II                          | CA127                  | 2,34E+07    | 6,34E+06 | 5        | 3                                                      |
| H1H20631D                            | CA127                  | 1,33E+03    | 2,91E+03 | 3        | 4                                                      |

**Пример 13. Определение биологической активности антитела против IsdB х против C1q в комбинации с являющимся стандартом лечения антибиотиком в модели бактериемии *S. aureus* MRSA на мышах**

[00272] Модель бактериемии, описанную выше в примере 12, использовали для оценки активности биспецифического антитела против IsdB х против C1q, против штаммов *S. aureus* MRSA для уменьшения бактериальной нагрузки при использовании в комбинации с являющимся стандартом лечения антибиотиком.

**Экспериментальный способ:**

[00273] Мышей с гуманизированным C1q (C1q<sup>Hu/Hu</sup>) инфицировали внутрибрюшинно с использованием  $1,3 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на мышь *S. aureus* MW2 в объеме 200 мкл. *S. aureus* MW2 выращивали до логарифмической фазы,  $OD_{600} \leq 1$ , в TSB при 37°C и промывали 3 раза в PBS, и доводили до желательной плотности для инфекции. Начиная с восемнадцати (18) часов после инфекции, 2 группы мышей (n=5) подвергали обработке с использованием 80 мг/кг линезолида посредством желудочного зонда (в объеме 200 мкл), дважды в сутки на сутки 1, 2 и 3. Через двадцать четыре (24) часа после инфекции, мышам вводили однократную дозу 100 мкг биспецифического антитела против IsdB х против C1q, обозначенного H1H20631D (См. таблицу 6), или PBS в объеме 100 мкл, внутрибрюшинно. Мышей взвешивали ежесуточно до суток 4 после инфекции и регистрировали изменения массы. Мышей подвергали эвтаназии на сутки 4 и почки, легкие и сердца собирали для определения нагрузки на орган. Кратко, органы гомогенизировали в 5 мл PBS с использованием устройства gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec) с использованием программы-E. Затем гомогенаты тканей разводили в PBS, и кратные 10-кратные серийные разведения рассеивали на чашки с LB с агаром и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующие сутки индивидуальные колонии подсчитывали для определения бактериальной нагрузки, и результаты регистрировали как КОЕ/грамм ткани.

**Обобщение результатов и заключения:**

[00274] Биспецифическое антитело против IsdB х против C1q, H1H20631D, тестировали параллельно с являющимся стандартом лечения антибиотиком, линезолидом, по эффективности для уменьшения бактериальной нагрузки на почку, легкое и сердце мышей с гуманизированным C1q. По сравнению с мышами для контроля инфекции (мышами, которым не вводили антибиотика или антитела), где 8,5 log КОЕ *S. aureus* выделено из почек на сутки 4, наблюдали уменьшение на 2,5 log общего количества КОЕ после обработки H1H20631D, по сравнению с немного меньшим, чем на 2 log, уменьшением КОЕ при обработке линезолидом. У мышей после обработки комбинацией H1H20631D и линезолида, наблюдали уменьшение на 3,5 log КОЕ *S. aureus*. В легком, обработка с использованием любого отдельного средства, H1H20631D или линезолида, приводила к уменьшению на 2 log общего количества КОЕ. У мышей после обработки комбинацией H1H20631D и линезолида, наблюдали уменьшение на 4 log КОЕ *S. aureus* в легких. Подобным образом, в сердце, обработка H1H20631D приводила к уменьшению на

4 log КОЕ, и линезолид приводил к уменьшению на 3 log КОЕ. Для мышей после обработки комбинацией H1H20631D и линезолида, авторы настоящего изобретения не смогли культивировать никаких бактерий из сердца (данные в таблице представляют собой предел детекции в анализе  $10^3$  КОЕ).

**[00275]** В совокупности, биспецифическое антитело против IsdB x против C1q может иметь аддитивную эффективность с линезолидом для уменьшения бактериальной нагрузки на органы в линии мышей с гуманизированным C1q при бактериемии *S. aureus* MRSA.

**Обобщение данных в таблице:**

**[00276]** В таблице 22 ниже показана нагрузка *S. aureus* на почки через 3 суток после обработки с использованием линезолида и 5 мг/кг биспецифического антитела против IsdB x против C1q.

**Таблица 22**

| Обработка AbPID (100 мкг/мышь) | Антибиотик | КОЕ/г почки | SD       | Мыши (n) |
|--------------------------------|------------|-------------|----------|----------|
| Нет                            | Нет        | 5,80E+08    | 1,22E+08 | 3        |
| H1H20631D                      | Нет        | 1,56E+06    | 1,56E+05 | 3        |
| H1H20631D                      | Линезолид  | 1,65E+05    | 3,60E+05 | 4        |
| Нет                            | Линезолид  | 6,99E+06    | 2,14E+07 | 4        |

**[00277]** В таблице 23 ниже показана нагрузка *S. aureus* на легкое через 3 суток после обработки с использованием линезолида и 5 мг/кг биспецифического антитела против IsdB x против C1q.

**Таблица 23**

| Обработка AbPID (100 мкг/мышь) | Антибиотик | КОЕ/г легкого | SD       | Мыши (n) |
|--------------------------------|------------|---------------|----------|----------|
| Нет                            | Нет        | 5,18E+07      | 7,43E+07 | 3        |
| H1H20631D                      | Нет        | 4,36E+05      | 1,04E+05 | 3        |
| H1H20631D                      | Линезолид  | 3,13E+03      | 1,47E+04 | 4        |
| Нет                            | Линезолид  | 6,98E+05      | 3,81E+05 | 4        |

**[00278]** В таблице 24 ниже показана нагрузка *S. aureus* на сердце через 3 суток после обработки с использованием линезолида и 5 мг/кг биспецифического антитела против IsdB x против C1q.

**Таблица 24**

| Обработка AbPID (100 мкг/мышь) | Антибиотик | КОЕ/г сердца | SD       | Мыши (n) |
|--------------------------------|------------|--------------|----------|----------|
| Нет                            | Нет        | 2,63E+08     | 3,99E+08 | 3        |
| H1H20631D                      | Нет        | 2,04E+04     | 2,43E+05 | 3        |
| H1H20631D                      | Линезолид  | 1,00E+03     | 2,54E+04 | 4        |
| Нет                            | Линезолид  | 2,08E+05     | 2,11E+05 | 4        |

**[00279]** Объем настоящего изобретения не является ограниченным конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем описании. Действительно, различные модификации по настоящему изобретению в дополнение к описанным в настоящем описании, станут очевидными для специалиста в данной области из

предшествующего описания. Такие модификации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:
  - a) первый антигенсвязывающий домен, который связывает антиген-мишень из вида *Staphylococcus*; и
  - b) второй антигенсвязывающий домен, который связывает компонент комплемента.
2. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, связывающая антиген-мишень из вида *Staphylococcus* с  $EC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее.
3. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1 или п.2, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула стимулирует накопление C1q человека на поверхности вида *Staphylococcus* с  $EC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее.
4. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-3, где первый антигенсвязывающий домен связывает антиген-мишень *Staphylococcus aureus*.
5. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.4, где первый антигенсвязывающий домен связывает антиген IsdB *Staphylococcus aureus*.
6. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.5, где белок IsdB *Staphylococcus aureus* содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 3-574 из SEQ ID NO:169.
7. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-6, где второй антигенсвязывающий домен связывает компонент комплемента C1q.
8. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.7, где компонент комплемента C1q представляет собой C1q человека.
9. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 5-8, где первый антигенсвязывающий домен связывает IsdB *Staphylococcus aureus* с  $K_D$  менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно 90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40 пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно 0,1 пМ, или менее, чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

10. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 7-9, где второй антигенсвязывающий домен связывает компонент комплемента C1q с K<sub>D</sub> менее, чем приблизительно 25 нМ, менее, чем приблизительно 20 нМ, менее, чем приблизительно 15 нМ, менее, чем приблизительно 10 нМ, менее, чем приблизительно 5 нМ, менее, чем приблизительно 1 нМ, менее, чем приблизительно 500 пМ, менее, чем приблизительно 400 пМ, менее, чем приблизительно 300 пМ, менее, чем приблизительно 200 пМ, менее, чем приблизительно 100 пМ, менее, чем приблизительно 90 пМ, менее, чем приблизительно 80 пМ, менее, чем приблизительно 70 пМ, менее, чем приблизительно 60 пМ, менее, чем приблизительно 50 пМ, менее, чем приблизительно 40 пМ, менее, чем приблизительно 30 пМ, менее, чем приблизительно 20 пМ, менее, чем приблизительно 10 пМ, менее, чем приблизительно 5 пМ, менее, чем приблизительно 4 пМ, менее, чем приблизительно 2 пМ, менее, чем приблизительно 1 пМ, менее, чем приблизительно 0,5 пМ, менее, чем приблизительно 0,2 пМ, менее, чем приблизительно 0,1 пМ, или менее, чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

11. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-10, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

а) три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащиеся внутри варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 154; и

б) три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащиеся внутри варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:146 или аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:162.

12. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.11, где HCDR включают:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:140, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:142, и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:144; или

б) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:156, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:158, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:160.

13. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.12, где LCDR включают:

а) CDR1 легкой цепи (LCDR), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:148, CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:150, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:152; или

b) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:164, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:166, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:168.

14. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.13, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

a) набор HCDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 140, 142, 144, и набор LCDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:148, 150, 152; или

b) набор HCDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 156, 158, 160, и набор LCDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:164, 166, 168.

15. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-14, где первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146 или SEQ ID NO: 154/162.

16. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-15, где второй антигенсвязывающий домен связывает C1q, где C1q содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:170, 171 и 172.

17. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.16, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgG1-k человека с  $IC_{50}$  приблизительно 10 нМ или менее.

18. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.17, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует связывание C1q человека с IgM человека с  $IC_{50}$  приблизительно 50 нМ или менее.

19. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-18, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

a) три HCDR, содержащиеся внутри HCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 114, 122 или 130; и

b) три LCDR, содержащиеся внутри LCVR, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:146 или аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:162.

20. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.19, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

a) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 100, 108, 116, 124 или 132;

b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 102, 110, 118, 126 или 134; и

c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128 или 136.

21. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.20, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:148, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:150, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:152; или

б) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:164, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:166, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:168.

22. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.20, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

а) набор HCDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 4, 6, 8; SEQ ID NO:12, 14, 16; SEQ ID NO:92, 94, 96; SEQ ID NO:100, 102, 104; или SEQ ID NO:108, 110, 112, и набор LCDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:148, 150, 152; или

б) набор HCDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 20, 22, 24; SEQ ID NO:28, 30, 32; SEQ ID NO:36, 38, 40; SEQ ID NO:44, 46, 48; SEQ ID NO:52, 54, 56; SEQ ID NO:60, 62, 64; SEQ ID NO:68, 70, 72; SEQ ID NO:76, 78, 80; SEQ ID NO:84, 86, 88; SEQ ID NO: 116, 118, 120; SEQ ID NO:124, 126, 128; или SEQ ID NO:132, 134, 136, и набор LCDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:164, 166, 168.

23. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-22, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит три HCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:140, 142, 144, и три LCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 148, 150, 152; и

б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит три HCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:4, 6, 8, и три LCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:148, 150, 152.

24. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-23, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит три HCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:140, 142, 144, и три LCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 148, 150, 152; и

б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит три HCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:108, 110, 112, и три LCDR, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 148, 150, 152.

25. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-24, содержащая:

а) первый антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146, или SEQ ID NO:154/162; и

б) второй антигенсвязывающий домен, который содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:2/146, 10/146, 90/146, 98/146, 106/146, 66/162, 74/162, 82/162, 18/162, 26/162, 34/162, 42/162, 50/162, 58/162, 114/162, 122/162 или 130/162.

26. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.25, где

а) первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146; и

б) второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:2/146.

27. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.25, где

а) первый антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146; и

б) второй антигенсвязывающий домен содержит пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:106/146.

28. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая связывается с тем же самым эпитопом на IsdB, что и эталонное антитело, содержащее пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:138/146.

29. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая связывается с тем же самым эпитопом на C1q человека, что и эталонное антитело, содержащее пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:2/146 или SEQ ID NO:106/146.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-29 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

31. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифическое антитело по любому из пп. 1-29.

32. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.31.

33. Клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.32.

34. Способ ингибирования роста видов *Staphylococcus* у субъекта, включающий введение выделенного биспецифического антитела по любому из пп. 1-29 или фармацевтической композиции по п.30 субъекту.

35. Способ по п.34, где вид *Staphylococcus* представляет собой *Staphylococcus aureus*.

36. Способ по п.35, где вид *Staphylococcus* представляет собой устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus*.

37. Способ лечения или предотвращения инфекции видом *Staphylococcus* у субъекта, включающий введение выделенного биспецифического антитела по любому из пп. 1-29 или фармацевтической композиции по п.30 субъекту.

38. Способ по п.37, где вид *Staphylococcus* представляет собой *Staphylococcus aureus*.

39. Способ по п.38, где вид *Staphylococcus* представляет собой устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus*.

40. Способ по любому из пп. 34-39, дополнительно включающий введение второго лекарственного средства.

41. Способ по п.40, где второе лекарственное средство включает антибиотик, антитело, которое связывает антиген *Staphylococcus*, антитело, которое связывает токсин *Staphylococcus*, антитело, которое связывает C1q человека или яванского макака, вакцину, специфическую для вида *Staphylococcus*, конъюгат антитела с лекарственным средством, биспецифическое антитело, конъюгированное с антибиотиком, или их комбинации.

42. Способ по любому из пп. 34-41, где субъект имеет заболевание или нарушение, включающее кожную инфекцию, целлюлит, пневмонию, менингит, инфекцию мочевыводящих путей, синдром токсического шока, эндокардит, перикардит, остеомиелит, бактериемию или сепсис.

43. Способ по любому из пп. 34-41, где субъекта подвергали или будут подвергать хирургической процедуре.

44. Способ по п.43, где хирургическая процедура включает имплантацию протеза.

45. Способ по п.44, где протез представляет собой протез конечности или сустава.

46. Способ по п.44, где протез представляет собой протез руки или ноги.

47. Способ по п.44, где протез представляет собой косметический протез.

48. Способ по п.47, где косметический протез представляет собой глазной протез или силиконовые кисти рук, пальцы рук, молочные железы, ступни, пальцы ног или лицевой имплантат.