

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036953**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.01.19**

**(21)** Номер заявки  
**201791086**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.12.18**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)  
**A61K 39/42** (2006.01)  
**A61K 31/215** (2006.01)

---

**(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА**

---

**(31)** 62/094,752; 62/152,122

**(32)** 2014.12.19; 2015.04.24

**(33)** US

**(43)** 2018.01.31

**(86)** PCT/US2015/066654

**(87)** WO 2016/100807 2016.06.23

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Перселл Лиза А., Вайяу Джонатан,  
Олсон Уилльям (US)**

**(74)** Представитель:  
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов  
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва  
А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В.,  
Христофоров А.А. (RU)**

**(56)** SUI JIANHUA ET AL.: "Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses", NATURE STRUCTURAL AND MOLECULAR BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, [Online] vol. 16, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 265-273, XP002538005, ISSN: 1545-9993, DOI: 10.1038/NSMB.1566 Retrieved from the Internet: URL:10.1038/NSMB.1566> [retrieved on 2009-02-22] abstract Figures, discussion

---

**(57)** Изобретение относится к моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с белком гемагглютинином (НА) вируса гриппа, к фармацевтическим композициям, содержащим антитела, а также к способам применения. Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для ингибирования или нейтрализации активности вируса гриппа с обеспечением, таким образом, средства лечения или предупреждения инфекции вируса гриппа у людей. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к применению одного или нескольких антител, которые связываются с НА вируса гриппа, для предупреждения прикрепления вируса к клеткам-хозяевам и/или вхождения такового в клетки-хозяева. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы профилактически или терапевтически и могут быть использованы отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими противовирусными средствами или вакцинами.

---

**B1**

**036953**

**036953**

**B1**

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с гемагглютинином вируса гриппа (НА), к композициям, содержащим такие антитела, а также к терапевтическим и диагностическим способам применения таких антител.

### Перечень последовательностей

Соответствующий ASCII текстовый файл перечня последовательностей подается одновременно с настоящим описанием (37 CFR § 1,52 (e) и 37 CFR § 1,821). Содержимое текстового файла включено в настоящий документ посредством ссылки. Содержащий перечень последовательностей текстовый файл под названием "10119WO01\_seqlisting" был создан 18 ноября 2015 г. и имеет размер 2,1 Мб.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Грипп является высококонтагиозным заболеванием, которое имеет долгую историю, характеризующуюся волнами пандемий, эпидемий, рецидивов и вспышек. Несмотря на ежегодные усилия по вакцинации, инфекции гриппа приводят к значительной заболеваемости и смертности.

Вирусы гриппа делятся на три типа: А, В и С. Кроме того, вирусы гриппа А могут быть классифицированы на подтипы на основании аллельных вариаций в антигенных участках двух генов, которые кодируют поверхностные гликопротеины гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (NA), необходимые для прикрепления вируса к клетке-хозяину и вхождения такого в клетку-хозяина.

Гемагглютинин представляет собой трехмерный гликопротеин, который содержит два структурных домена, глобулярный головной домен, состоящий из сайта связывания с рецептором (который подвергается частому антигенному дрейфу), и стеблевой участок (более консервативный у различных штаммов вируса гриппа). Белок НА синтезируется в виде предшественника (НА0), который подвергается протеолитическому процессингу с образованием двух субъединиц (НА1 и НА2), которые ассоциируются друг с другом с образованием структуры стебель/глобулярная голова. Пептид НА1 отвечает за прикрепление вируса к клеточной поверхности. Пептид НА2 образует подобную стеблею структуру, которая опосредует слияние вирусной и клеточной мембран в эндосомах, что обеспечивает высвобождение рибонуклеопротеинового комплекса в цитоплазму.

На сегодняшний день известны 18 подтипов, определяемых их гемагглютининовыми белками (Н1-Н18). 18 НА могут быть классифицированы на две группы. Группа 1 состоит из подтипов Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17 и Н18, а группа 2 включает в себя подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15.

Новые штаммы одного подтипа могут возникать в результате явления, называемого антигенным дрейфом, или мутаций в молекулах НА или NA, которые формируют новые и отличающиеся эпитопы. Вследствие этого каждый год должна выпускаться новая вакцина против вирусов, появление которых прогнозируется, а это процесс не только дорогостоящий, но и крайне неэффективный. В то время как технический прогресс улучшил возможность получения улучшенного антигена(ов) гриппа для вакцинных композиций, сохраняется потребность в дополнительных источниках защиты для борьбы с возникающими подтипами и штаммами вируса гриппа.

В то время как идея вакцинной композиции, содержащей представляющий интерес антиген (например, НА и/или NA), для образования широко нейтрализующих антител у пациента, как правило, считается хорошим подходом, применение данного подхода не всегда является желательным для некоторых групп пациентов. Например, для некоторых пациентов вакцинная композиция, содержащая представляющий интерес антиген, не всегда может быть эффективной, например для пожилых, для очень молодых, для пациентов с ослабленным иммунитетом и т.д. Для этих групп пациентов или для любого другого пациента, у которого не может развиться эффективный иммунный ответ, может быть более полезным предоставление композиции, уже содержащей широко нейтрализующие антитела, которые могут нацеливаться на эпитопы, общие для ряда штаммов с подтипами группы 1 и/или группы 2.

На сегодняшний день был достигнут незначительный успех в идентификации таких антител, которые широко нейтрализуют или ингибируют вирусы гриппа. Okuno et al. иммунизировали мышей вирусом гриппа А/Okuda/57 (H2N2) и выделили антитело, обозначенное С179, которое связывалось с консервативным конформационным эпитопом в НА2 и нейтрализовало вирусы гриппа А подтипа Н2, Н1 и Н5 группы 1 *in vitro* и *in vivo* (Okuno et al. (1993) *J. Virol.* 67(5): 2552-2558). Throsby et al. идентифицировали 13 моноклональных антител из человеческих В-клеток, которые обладали широкой активностью против подтипов группы 1 (Throsby et al. (2008), *PLOS one* 3(2): e3942). Sui et al. идентифицировали человеческое моноклональное антитело (F10), которое связывало Н5 и другие вирусы группы 1 (Sui, et al. (2009), *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(3): 265-273).

Однако после десятилетий исследований в этой области только несколько антител в настоящее время проходят клинические испытания по оценке их способности нейтрализовать вирусы гриппа различных подтипов (см., например, антитела, разработанные Crucell Holland ((US 2012/0276115, US 2014/0065156, US 8470327, US 2014/0120113, EP 2731967, US 8691223, US 2013/0243792, US 2014/0065165, WO 2008/028946 и WO 2010/130636); Osaka University (US 2011/0319600, EP 2380976, US 2012/0058124, US 2012/0058124), Celltrion (US 2013/0004505, EP 2545074, WO 2014/158001); Vanderbilt University (US 2013/0289246), SeaLane Biotechnologies (US 2012/0128671), Trellis Bioscience, Inc. (US

2012/0020971 EP 2582721); Visterra, Inc. (US 2013/0302349); Burnham Institute/Dana Farber (US 2014/011982, EP 2222701, WO 2010/027818); Temasek (US 8444986, US 8574581, US 8637644, US 8637645, US 8383121, US 8540996, US 8574830, US 8540995); HUMABS Biosciences/Institute for Research in Biomedicine (US 8871207); MedImmune (WO 2015/051010) и Genentech (US 2014/0161822), но на рынке все еще отсутствуют антитела, которые широко нейтрализуют или ингибируют вирусную инфекцию гриппа А или ослабляют заболевание, вызванное различными подтипами этого вируса. Следовательно, в данной области все еще существует потребность в идентификации новых антител, нейтрализующих многочисленные подтипы вируса гриппа А, которые могут быть использованы для профилактики или лечения инфекции вируса гриппа.

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают гемагглютинин вируса гриппа (НА). Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы *inter alia* для ингибирования или нейтрализации активности НА вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела применимы для блокирования прикрепления вируса гриппа к клетке-хозяину и/или для предупреждения вхождения такового в клетки-хозяева. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела функционируют путем ингибирования передачи вируса от клетки к клетке. Согласно определенным вариантам осуществления антитела применимы в предупреждении, лечении или облегчении по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут быть введены профилактически или терапевтически субъекту с инфекцией вируса гриппа или с риском приобретения таковой. Согласно определенным вариантам осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело в соответствии с настоящим изобретением, могут быть введены субъекту, для которого вакцина противопоказана или для которого вакцина является менее эффективной, например пожилому пациенту, очень молодому пациенту, пациенту, у которого может быть аллергия на любой один или несколько компонентов вакцины, или пациенту с ослабленным иммунитетом, который может не отвечать на иммуногены в вакцине. Согласно определенным вариантам осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело в соответствии с настоящим изобретением, могут быть введены медицинскому персоналу, госпитализированным пациентам, или пациентам домов престарелых, или другим пациентам с повышенным риском во время вспышки гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело в соответствии с настоящим изобретением, могут быть введены пациентам в качестве терапии первой линии в случае, если прогнозируемая ежегодная вакцина является неэффективной, или в случае пандемии со штаммом, который подвергся главной антигенной изменчивости.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только связывающую антиген часть (например, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> или scFv) и могут быть модифицированы с влиянием на функциональность, например, с повышением персистенции у хозяина, или с усилением эффекторной функции, или с устранением остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933). Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут быть биспецифическими.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с НА вируса гриппа.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) гриппа А, при этом антитело обладает двумя или более из следующих характеристик:

- (a) является полностью человеческим моноклональным антителом;
- (b) связывается с НА вируса гриппа с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-9}$  М, как измерено биосенсором на основе интерферометра в биослое в режиме реального времени (анализ Octet HTX);
- (c) демонстрирует полупериод диссоциации ( $t^{1/2}$ ) более 370 мин;
- (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов гриппа А группы 1, выбранных из H1N1, H5N1, H9N2, H13N6 и H16N3, с  $IC_{50}$  менее 130 нМ;
- (e) демонстрирует опосредованный комплементом лизис инфицированных вирусом гриппа клеток с  $EC_{50}$  менее 66 нМ;
- (f) демонстрирует защиту, как измерено с помощью повышения выживаемости на животной модели инфекции вируса гриппа, при введении либо до, либо после заражения вирусом; или
- (g) при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарных участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), находящихся в любой из последовательностей переменного участка тяжелой цепи (HCVR), приведенных в табл. 1 или 12; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), находящихся в любой из последовательностей переменного участка легкой цепи (LCVR), приведенных в табл. 1 или 12.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением де-

монстрирует полупериод диссоциации у обезьян, который в приблизительно 1,5 раза превышает таковой антитела сравнения, названного mAb контроля I, и полупериод диссоциации у мышей, который в приблизительно 2 раза превышает таковой mAb контроля I.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует усиление защиты по сравнению с осельтамивиром при введении через 48 ч после инфицирования или через 72 ч после инфицирования млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа.

Согласно родственному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает усиление защиты у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении либо подкожно, либо внутривенно и/или при введении до инфицирования или после инфицирования вирусом гриппа.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует усиление защиты по сравнению с животным, которому вводили изотипическое антитело (отрицательного) контроля, при введении инфицированному млекопитающему в виде однократной подкожной или внутривенной дозы, варьирующей от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует усиление защиты при введении инфицированному вирусом гриппа млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы приблизительно 15 мг/кг по сравнению с пероральным введением осельтамивира, вводимого два раза в сутки в течение 5 суток дозой от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует показатель выживаемости более приблизительно 20% у млекопитающих, инфицированных вирусом гриппа, при введении профилактически в виде однократной подкожной дозы, варьирующей от приблизительно 0,01 до приблизительно 2 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует показатель выживаемости более приблизительно 30% у млекопитающих, инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы, варьирующей от приблизительно 7 до приблизительно 50 мг/кг по меньшей мере через 24 ч после инфицирования.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует показатель выживаемости от приблизительно 30 до приблизительно 60% у млекопитающих, инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы от приблизительно 7 до приблизительно 50 мг/кг при введении через 48 ч после инфицирования.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует показатель выживаемости, равный или превышающий приблизительно 60%, у млекопитающих, инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы от приблизительно 15 до приблизительно 30 мг/кг через 48 ч или более после инфицирования.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует показатель выживаемости приблизительно 100% у млекопитающих, инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы приблизительно 15 мг/кг через 48 ч или более после инфицирования.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует показатель выживаемости приблизительно 100% у млекопитающих, инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы приблизительно 15 мг/кг по сравнению с 40% показателем выживаемости, наблюдаемым с осельтамивиром при введении перорально два раза в сутки в течение 5 суток дозой приблизительно 25 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает аддитивный защитный эффект у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении с осельтамивиром более чем через 48 ч после инфицирования.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает аддитивный защитный эффект у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении с осельтамивиром через 72 ч после инфицирования.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает аддитивный защитный эффект при использовании в комбинации с осельтамивиром, если антитело вводят инфицированному вирусом гриппа млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы, варьирующей от приблизительно 7 до приблизительно 15 мг/кг, а осельтамивир вводят перорально два раза в сутки в течение 5 суток дозой приблизительно 25 мг/кг.

Согласно родственному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает аддитивный защитный эффект при использовании в комбинации с осельтамивиром через 72 ч после инфицирования вирусом гриппа, при этом антитело вводят в виде однократной внутривенной дозы, варьирующей от приблизительно 7 до приблизительно 15 мг/кг, а осельтамивир вводят перорально два раза в сутки в течение 5 суток дозой приблизительно 25 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением мо-

жет быть введено внутривенно, интраназально, подкожно, внутрикожно или внутримышечно, а осельтамивир может быть введен перорально.

Согласно одному варианту осуществления осельтамивир вводят до введения, одновременно с введением или после введения антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному варианту осуществления антитело и/или осельтамивир могут быть введены в виде однократной дозы или в виде нескольких доз.

Типичные антитела против HA вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением приведены в табл. 1 и 2 в настоящем документе. В табл. 1 описываются идентификационные номера аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR), переменных участков легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител против HA вируса гриппа. В табл. 2 описываются идентификационные номера последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител против HA вируса гриппа.

Дополнительные типичные антитела против HA вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением приведены в табл. 12 и 13 в настоящем документе. В табл. 12 описываются идентификационные номера аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR), переменных участков легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител против HA вируса гриппа. В табл. 13 описываются идентификационные номера последовательностей нуклеиновых кислот для HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител против HA вируса гриппа.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к этим последовательностям.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают HA вируса гриппа, содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282 и 290.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к этим последовательностям.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают HA вируса гриппа и содержат LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210 и 226.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1 или 12, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1 или 12. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, находящуюся в любом из типичных антител против HA вируса гриппа, приведенных в табл. 1 или 12.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают HA вируса гриппа, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 50/66, 74/82, 74/66, 90/98, 106/114, 122/130, 138/146, 154/162, 170/178, 186/194, 202/210, 218/226, 234/66, 242/66, 250/66, 258/66, 266/66, 274/66, 282/66 и 290/66.

Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 (например, H1H11729P), 50/58 (например, H1H11829N), 50/66 (например, H1H11829N2) или 106/114 (например, H1H14571N).

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284 и 292;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286 и

294;

(с) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288 и 296;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212 и 228;

(е) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214 и 230; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216 и 232.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают HA вируса гриппа, содержат (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 20, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 22; (с) HCDR3 из SEQ ID NO: 24; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 28; (е) LCDR2 из SEQ ID NO: 30 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 32.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают HA вируса гриппа, содержат (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 52, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 54; (с) HCDR3 из SEQ ID NO: 56; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 68; (е) LCDR2 из SEQ ID NO: 70 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 72.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают HA вируса гриппа, содержат (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 52, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 54; (с) HCDR3 из SEQ ID NO: 56; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 60; (е) LCDR2 из SEQ ID NO: 62 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 64.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают HA вируса гриппа, содержат (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 108, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 110; (с) HCDR3 из SEQ ID NO: 112; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 116; (е) LCDR2 из SEQ ID NO: 118 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 120.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1 или 12, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1 или 12, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1 или 12. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, находя-

щуюся в любом из типичных антител против HA вируса гриппа, приведенных в табл. 1 или 12. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24/32 (например, H1H11729P), 56/64 (например, H1H11829N), 56/72 (например, H1H11829N2) и 112/120 (например, H1H14571N).

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим ряд из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), находящийся в любом из типичных антител против HA вируса гриппа, приведенных в табл. 1 или 12. Согласно определенным вариантам осуществления ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32 (например, H1H11729P), 52-54-56-60-62-64 (например, H1H11829N); 52-54-56-68-70-72 (например, H1H11829N2), а также 108-110-112-116-118 и 120 (например, H1H14571N).

Согласно родственному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим ряд из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), находящийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определяемой в любом из типичных антител против HA вируса гриппа, приведенных в табл. 1 или 12. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, находящийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 (например, H1H11729P), 50/58 (например, H1H11829N), 50/66 (например, H1H11829N2) и 106/114 (например, H1H14571N). Способы и методики для идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в уровне техники и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрываемых в настоящем документе. Типичные методы, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих чертах, определение по Kabat основывается на вариативности последовательностей, определение по Chothia основывается на расположении структурных петельных участков, а определение по AbM представляет собой компромиссное решение между подходами 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. Set. USA 86: 9268-9272 (1989)). Также имеются общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение относится к антителам против HA вируса гриппа, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть применима модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или антитела, в котором отсутствует фрагмент фукозы в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277: 26733). В других применениях может быть осуществлена модификация галактозилирования с целью модификации зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC).

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание с HA вируса гриппа с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в табл. 1 или 12.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно конкурируют за связывание с HA вируса гриппа или которые связывают один и тот же эпитоп в HA вируса гриппа, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в табл. 1 или 12.

Настоящее изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют прикрепление HA вируса гриппа к клетке-хозяину и/или входение в клетку-хозяина.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением являются биспецифическими, характеризующимися первой специфичностью связывания с первым эпитопом в HA вируса гриппа и второй специфичностью связывания с другим антигеном.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против HA вируса гриппа или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1 или 2; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в табл. 2 или 13, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей





в табл. 1 или 12. Согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в табл. 2 или 13, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к этим последовательностям, а также полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, приведенных в табл. 2, или в значительной степени подобную им последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к этим последовательностям. Согласно определенным вариантам осуществления аспекта настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом как HCVR, так и LCVR походят от одного и того же антитела против HA вируса гриппа, приведенного в табл. 1 или 12.

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, приведенных в табл. 1 или 12. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, приведенных в табл. 1 или 12.

Согласно родственному аспекту настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным к экспрессии полипептида, содержащего вариативный участок тяжелой или легкой цепи антитела против HA вируса гриппа. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, т.е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, описанных в табл. 1 или 12. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих получение антител или фрагментов антител и извлечение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают HA вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно родственному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела против HA вируса гриппа и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту осуществления вторым терапевтическим средством является любое средство, которое успешно комбинируется с антителом против HA вируса гриппа. Типичные средства, которые могут быть успешно скомбинированы с антителом против HA вируса гриппа, включают в себя без ограничения другие средства, которые связывают HA вируса гриппа и/или ингибируют его активность (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые не связывают непосредственно HA вируса гриппа, но, тем не менее, ингибируют вирусную активность, в том числе способность инфицирования клеток-хозяев. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (а) первое антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом первое антитело связывается с первым эпитопом в HA вируса гриппа, а второе антитело связывается со вторым эпитопом в HA вируса гриппа, при этом первый и второй эпитопы являются обособленными и неперекрывающимися; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (а) первое антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом первое антитело не конкурирует перекрестно со вторым антителом за связывание с HA вируса гриппа; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (а) первое антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с другим антигеном вируса гриппа, при этом первое антитело связывается с эпитопом в HA вируса гриппа, и второе антитело связывается с эпитопом в другом антигене вируса гриппа; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (а) первое антитело против HA вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с антигеном другого вируса (не являющегося вирусом гриппа), при этом первое антитело связывается с эпитопом в HA вируса гриппа, а второе антитело связывается с эпитопом в антигене другого вируса (не являющегося вирусом гриппа); и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Дополнительные комбинированные терапевтические средства и совместные составы, включающие в себя антитела против HA вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, раскрываются в другом месте настоящего документа.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лече-

ния заболевания или нарушения, ассоциированного с НА вируса гриппа, (такого как вирусная инфекция у субъекта), или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с вирусной инфекцией, с использованием антитела против НА вируса гриппа или связывающей антиген части антитела в соответствии с настоящим изобретением, при этом терапевтические способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением, субъекту при необходимости этого. Подлежащим лечению нарушением является любое заболевание или состояние, которое улучшают, облегчают, ингибируют или предупреждают путем ингибирования активности НА вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам предупреждения лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа А, при этом способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества антитела против НА вируса гриппа или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением субъекту при необходимости этого.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам облегчения или уменьшения тяжести, длительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа у субъекта путем введения антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, при этом по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, болей, ринореи (заложенности носа), озноба, утомления, слабости, боли в горле, кашля, затруднения дыхания, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и смерти.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам снижения вирусной нагрузки у субъекта, при этом способы предусматривают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, которые связывают НА вируса гриппа и блокируют связывание НА вируса гриппа с клеткой-хозяином и/или вхождение в клетку-хозяина.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены профилактически или терапевтически субъекту, страдающему инфекцией вируса гриппа, или подверженному риску таковой, или предрасположенному к развитию таковой. Подверженные риску субъекты включают в себя без ограничения человека с ослабленным иммунитетом, например человека с ослабленным иммунитетом по причине аутоиммунного заболевания, или людей, получающих подавляющую иммунитет терапию (например, после трансплантации органа), или людей, пораженных синдромом иммунодефицита человека (HIV) или синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS), некоторыми формами анемии, которая истощает или разрушает белые кровяные клетки, людей, получающих радиационную или химиотерапию, или людей, пораженных воспалительным нарушением. Другие субъекты, подверженные риску приобретения инфекции вируса гриппа, включают в себя пожилых (возрастом старше 65 лет), детей моложе 2 лет, работников здравоохранения и людей с первичными нарушениями, такими как легочная инфекция, заболевание сердца или сахарный диабет. Также любой человек, который вступает в физический контакт или тесную физическую близость с инфицированным индивидуумом, подвергается повышенному риску развития инфекции вируса гриппа. Более того, субъект рискует заразиться инфекцией вируса гриппа из-за близости к вспышке заболевания, например субъект пребывает в густонаселенном городе или в непосредственной близости к субъектам, имеющим подтвержденные или предполагаемые инфекции вируса гриппа, или из-за выбора работы, например сотрудник больницы, фармацевт-исследователь, путешественник в зараженную местность или человек, часто осуществляющий перелеты.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством субъекту при необходимости этого. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), противомикробного лекарственного средства, другого антитела против НА вируса гриппа, антитела против другого антигена вируса гриппа (например, нейраминидазы), противовирусного лекарственного средства, устраняющего застойные явления средства, противогистаминного средства, вакцины против гриппа, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, а также любого другого лекарственного средства или терапевтического средства, известного в уровне техники, применимого для облегчения по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа или для снижения вирусной нагрузки у пациента. Согласно определенным вариантам осуществления вторым терапевтическим средством может быть средство, которое помогает нейтрализовать или снижать любой возможный побочный эффект(ы), ассоциированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с настоящим изобретением, если такой побочный эффект(ы) может произойти. Антитело или его фрагмент могут быть введены подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, перорально, интраназально, интраназально, интратрахеально или интракраниально. Согласно одному варианту осуществления антитело может быть введено в виде однократной внутривенной инфузии для максимальной концентрации антитела в сыворотке крови субъекта. Антитело или его фрагмент могут быть введены дозой от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта. Согласно

определенным вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может быть введено одной или несколькими дозами, содержащими от 50 до 5000 мг.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела против НА вируса гриппа или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии с настоящим изобретением для лечения заболевания или нарушения, при котором будет полезна блокада связывания и/или активности НА вируса гриппа. Настоящее изобретение также относится к применению антитела против НА вируса гриппа или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением в изготовлении медицинского препарата для лечения заболевания или нарушения, при котором будет полезна блокада связывания и/или активности НА вируса гриппа.

Другие варианты осуществления станут понятны из обзора следующего подробного описания.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показано, что однократная доза H1N1729P через 48 ч после инфицирования демонстрирует большую эффективность, чем осельтамивир, через 48 ч после инфицирования при лечении тяжелой инфекции вируса гриппа А у мышей. Однократная доза H1N1729P при 15 мг/кг (кружочки), введенная через 48 ч после инфицирования, является более эффективной, чем осельтамивир (TAMIFLU®), вводимый два раза в сутки (BID) в течение 5 суток, начиная со дня 2 после инфицирования при 25 (перевернутые треугольники) или 5 мг/кг (ромбы). Мышей инфицировали интраназально (IN) в день 0 с помощью  $10 \times \text{MLD}_{50}$  A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1). Контрольные группы включали в себя неинфицированную (треугольники, пунктирная линия) и инфицированную (шестиугольники) группы, которые получали пероральным путем принудительно через желудочный зонд воду и CR8020 в качестве (отрицательного) контроля изотипа IgG1.

На фиг. 2 показано, что наблюдается аддитивная эффективность при объединении однократной дозы H1N1729P с осельтамивиром через 72 ч после инфицирования с лечением тяжелого гриппа у мышей. Мыши получали одну субэффективную дозу 7 (квадраты, пунктирная линия) или 15 мг/кг H1N1729P (кружочки, пунктирная линия), контрольный IgG (треугольники), 25 мг/кг BID осельтамивира в течение 5 суток (ромбы, пунктирная линия) или комбинацию однократной дозы 7 (квадраты, непрерывная линия) или 15 мг/кг H1N1729P (кружочки, непрерывная линия) и режим осельтамивира в течение 5 суток через 72 ч после интраназального (IN) инфицирования с помощью  $10 \times \text{MLD}_{50}$  A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1). Представлены результаты трех независимых испытаний (N=15 на группу).

На фиг. 3 показаны аминокислотные последовательности HCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCVR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 для антитела под названием H1N1729P.

На фиг. 4 показаны аминокислотные последовательности HCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCVR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 для антитела под названием H1N1829N2.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Перед описанием способов в соответствии с настоящим изобретением следует обратить внимание на то, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует учитывать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что обычно известно рядовому специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описываемым в настоящем документе, в осуществлении или тестировании настоящего изобретения, ниже описываются предпочтительные способы и материалы.

Определения.

Термин "гемагглютинин вируса гриппа", также называемый "НА вируса гриппа", представляет собой находящийся на поверхности вирионов гриппа трехмерный гликопротеин, который опосредует прикрепление вируса (посредством связывания HA1 с  $\alpha$ -2,3- и  $\alpha$ -2,6-сиаловыми кислотами) и входение (через конформационное изменение) в клетки-хозяева. НА состоит из двух структурных доменов: глобулярного головного домена, содержащего сайт связывания рецептора (подверженный антигенным мутациям с высокой частотой) и стеблевой участок (более консервативный у различных штаммов вируса гриппа). НА вируса гриппа синтезируется в виде предшественника (HA0), который подвергается протеолитическому процессингу с получением двух субъединиц (HA1 и HA2), которые ассоциируются друг с другом с образованием структуры стебель/глобулярная голова. Вирусный НА является наиболее вариабельным антигеном у вируса (18 подтипов могут быть разделены на две группы), а стебель (HA2) является высококонсервативным в каждой группе.

Аминокислотная последовательность полноразмерного НА вируса гриппа представлена аминокислотной последовательностью изолята вируса гриппа H1N1 A/California/04/2009, представленного в GenBank под номером доступа FJ966082.1. Термин "НА вируса гриппа" также включает в себя варианты белка НА вируса гриппа, выделенные из различных изолятов вируса гриппа, например GQ149237.1,

NC\_002017, KM972981.1 и т.д. Термин "НА вируса гриппа" также включает в себя НА рекомбинантного вируса гриппа или его фрагмент. Термин также охватывает НА вируса гриппа или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, с мышинным или человеческим Fc или с отдельной последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин "инфекция вируса гриппа", также описываемая как "грипп", относится к тяжелой острой респираторной болезни, вызываемой вирусом гриппа. Термин предусматривает инфекцию респираторного тракта и симптомы, которые включают в себя сильную лихорадку, головную боль, боль во всем теле и недомогание, утомление и слабость, в некоторых случаях сильное истощение, заложенный нос, чиханье, боль в горле, дискомфорт в области грудной клетки, кашель, затруднение дыхания, бронхит, пневмонию, а в тяжелых случаях смерть.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных вместе дисульфидными связями (т.е. "молекулы полного антитела"), а также к их мультимерам (например, IgM) или к их антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного участка тяжелой цепи ("HCVR" или "V<sub>H</sub>") и константного участка тяжелой цепи (состоящего из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного участка легкой цепи ("LCVR или "V<sub>L</sub>") и константного участка легкой цепи (C<sub>L</sub>). Участки V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть, кроме того, разделены на участки гипервариабельности, называемыми определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками (FR). Каждый V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения FR в антителе (или его антигенсвязывающем фрагменте) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественно или искусственно модифицированными. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании сравнительного анализа двух или более CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или удаление одного или нескольких CDR. В научной литературе были описаны антитела, в которых один или два CDR могут обходиться без связывания. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9: 133-139) анализировали участки контакта антител и их антигенов на основании опубликованных кристаллических структур и пришли к заключению, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании предварительных исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не являются необходимыми) из участков CDR по Kabat, лежащих вне CDR по Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(остатки) опускается, то он, как правило, замещается аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или в консенсусе таких последовательностей. Положения для замещения в CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замещения могут быть консервативными или неконсервативными замещениями.

Полностью человеческие моноклональные антитела против НА вируса гриппа, раскрываемые в настоящем документе, могут содержать одно или несколько аминокислотных замещений, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR участках вариабельных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые pochodят от любых аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, при этом одна или несколько аминокислот в одном или нескольких каркасных участках и/или участках CDR мутируют в соответствующий остаток(остатки) последовательности зародышевой линии, от которой походит антитело, или в соответствующий остаток(остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения в последовательностях совокупно в настоящем документе называют "мутациями зародышевой линии"). Специалист в данной области исходя из раскрываемых в настоящем документе последовательностей вариабельного участка тяжелой и легкой цепей сможет легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все из каркасных и/или CDR остатков в доменах V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub> обратно мутируют до остатков, находящихся в оригинальной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. Согласно другим вариантам осуществления только некоторые остатки мутируют обратно до оригинальной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, находящиеся в первых 8 аминокислотах из FR1 или в последних 8 аминокислотах из FR4, или только

мутированные остатки, находящиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально произошло антитело). Кроме того, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных участках и/или участках CDR, например, при этом определенные отдельные остатки мутируют до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от оригинальной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать на предмет одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретного случая), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные такими общими способами, предусматриваются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также относится к полностью человеческим моноклональным антителам против HA вируса гриппа, содержащим варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрываемых в настоящем документе, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам против HA вируса гриппа, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрываемых в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" предусматривает антитела, имеющие переменные и константные участки, происходящие из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb в соответствии с настоящим изобретением могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные произвольным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не предусматривает mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты на человеческие последовательности FR. Термин предусматривает антитела, полученные рекомбинантным путем в отличных от человека млекопитающих, или в клетках отличного от человека млекопитающего. Термин не предусматривает антитела, выделенные из человеческого субъекта или созданные в таковом.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантный" относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам в соответствии с настоящим изобретением, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным технологиями или способами, известными в уровне техники как технология рекомбинантной ДНК, которая предусматривает, например, сплайсинг и экспрессию трансгенной ДНК. Термин относится к антителам, экспрессированным у отличного от человека млекопитающего (в том числе у трансгенных отличных от человека млекопитающих, например, у трансгенных мышей), или в клеточной (например, в клетках CHO) системе экспрессии, или выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител.

Термин "специфически связывает", или "специфически связывается с", или подобный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание может быть охарактеризовано равновесной константой диссоциации по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М или меньше (например, меньшая  $K_D$  означает более прочное связывание). Способы определения того, будут ли две молекулы специфически связываться, хорошо известны в уровне техники и предусматривают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описывается в настоящем документе, с помощью безмаркерного анализа интерферометрии в биослое в режиме реального времени на биосенсоре Octet® HTX были идентифицированы антитела, которые специфически связываются с HA вируса гриппа. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в HA вируса гриппа и с одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифическое, которое связывается с двумя разными участками HA вируса гриппа, тем не менее, считают антителами, которые "специфически связываются", используемыми в настоящем документе.

Термин антитело "с высокой аффинностью" относится к таким mAb, которые характеризуются аффинностью связывания с HA вируса гриппа, выраженной как  $K_D$ , по меньшей мере  $10^{-8}$  М; предпочтительно  $10^{-9}$  М; более предпочтительно  $10^{-10}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-11}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-12}$  М, как измерено безмаркерным анализом интерферометрии в биослое в режиме реального

времени, например, на биосенсоре Octet® HTX, или с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или путем определения аффинности в растворе с помощью ELISA.

Термины "низкая скорость диссоциации", "Koff" или "kd" относятся к антителу, которое диссоциирует от HA вируса гриппа, с константой скорости  $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  или меньше, предпочтительно  $1 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$  или меньше, определяемой безмаркерным анализом интерферометрии в биослое в режиме реального времени, например, на биосенсоре Octet® HTX, или с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

Используемые в настоящем документе термины "связывающая антиген часть" антитела, "антиген-связывающий фрагмент" антитела и т.п. предусматривают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с HA вируса гриппа.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагменты антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть конъюгированы с фрагментом, например лигандом или терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как противовирусное лекарственное средство, второе антитело против вируса гриппа или любой другой терапевтический фрагмент, применимый для лечения инфекции, вызываемой HA вируса гриппа.

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое практически не содержит иных антител (Ab), обладающих специфичностями к другим антигенам (например, выделенное антитело, которое специфически связывает HA вируса гриппа, или его фрагмент, практически не содержащее Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от HA вируса гриппа).

Используемый в настоящем документе термин "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело" (или "антитело, которое нейтрализует активность HA вируса гриппа", или "антагонистическое антитело") относится к антителу, связывание которого с HA вируса гриппа приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности HA вируса гриппа. Например, антитело в соответствии с настоящим изобретением может предотвращать или блокировать прикрепление вируса гриппа к клетке-хозяину или входение в клетку-хозяина. Кроме того, "нейтрализующее антитело" является антителом, которое может нейтрализовать, т.е. предотвратить, ингибировать, снизить, препятствовать или мешать способности патогена инициировать и/или сохранять инфекцию у хозяина. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" используются взаимозаменяемо в настоящем документе. Такие антитела могут быть использованы, отдельно или в комбинации, в качестве профилактических или терапевтических средств с другими противовирусными средствами в подходящем составе, или в ассоциации с активной вакцинацией, или в качестве диагностического инструмента.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в режиме реального времени путем выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Интерферометрия в биослое представляет собой безмаркерную технологию для измерения биомолекулярных взаимодействий. Это оптическая аналитическая методика, которая анализирует паттерн интерференции белого света, отраженного от двух поверхностей: слоя иммобилизованного белка на наконечнике биосенсора и внутреннего эталонного слоя. Любое изменение в количестве молекул, связанных с наконечником биосенсора, вызывает сдвиг в паттерне интерференции, который может быть измерен в режиме реального времени (Abdiche, Y.N., et al. Analytical Biochemistry, (2008), 377(2), 209-217). Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения "биосенсор на основе интерферометра в биослое в режиме реального времени (анализ Octet HTX)" использовали для оценивания характеристик связывания некоторых из антител против HA вируса гриппа.

Используемый в настоящем документе термин "K<sub>D</sub>" относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в переменном участке молекулы антитела, известном как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с разными областями в антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту в антигене, с которым реагируют B- и/или T-клетки. Он также относится к участку антигена, который связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подгруппой структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоять из нелинейных аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые пред-

ставляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и согласно определенным вариантам осуществления могут обладать специфическими трехмерными структурными характеристиками и/или специфическими характеристиками заряда.

Используемый в настоящем документе термин "перекрестно конкурирует" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает в себя конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первое антитело, которое связывает и блокирует связывание второго антитела и наоборот. Согласно определенным вариантам осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися, эпитопами, так что связывание одного ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, посредством пространственного затруднения. Перекрестная конкуренция между антителами может быть измерена способами, известными в уровне техники, например, с помощью безмаркерного анализа интерферометрии в биослое в режиме реального времени. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала из-за самосвязывания (при этом первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестная конкуренция между 2 антителами может быть выражена, например, как % связывания второго антитела, который меньше исходного фонового самосвязывания (при этом первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

Термин "идентичность в значительной степени" или "в значительной степени идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента означает, что при оптимальном выравнивании с подходящими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей нитью) наблюдается идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая идентичностью в значительной степени в отношении эталонной молекулы нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид с такой же или в значительной степени подобной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "подобие в значительной степени" или "в значительной степени подобный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как, например, путем применения программ GAP или BESTFIT с использованием значения штрафа за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. Термин "консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень подобия могут быть отрегулированы с повышением для коррекции характера консервативности замены. Средства для такой регуляции хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амидосодержащие 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) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативной замены аминокислот являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативным замещением является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250 в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. Термин "умеренно консервативное" замещение означает любое изменение с неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Подобие последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет подобные последовательности путем применения критериев подобия, определяя различные замены, делеции и другие модификации, включая консервативные замены аминокислоты. Например, программный пакет GCG включает в себя программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последо-

вательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом (см., например, GCG версии 6.1). Полипептидные последовательности также можно сравнить с помощью FASTA, программы в GCG версии 6.1, с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей в участках с наибольшим сходством между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом для сравнения последовательности в соответствии с настоящим изобретением с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию (см., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402).

Выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое обеспечивает требуемый эффект, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в облегчении, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Субъект может страдать инфекцией вируса гриппа или может быть предрасположенным к развитию инфекции вируса гриппа. Субъектами, "предрасположенными к развитию инфекции вируса гриппа", или субъектами, "которые могут быть подвержены риску заражения инфекцией вируса гриппа", являются субъекты с ослабленными иммунными системами по причине аутоиммунного заболевания, люди, получающие подавляющую иммунотерапию (например, после трансплантации органа), или люди, пораженные синдромом иммунодефицита человека (HIV) или синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS), некоторыми формами анемии, которая истощает или разрушает белые кровяные клетки, люди, получающие радиационную или химиотерапию, или люди, пораженные воспалительным нарушением. Кроме того, повышенному риску подвергается слишком молодой или пожилой субъект. Любой человек, который вступает в физический контакт или тесную физическую близость с инфицированным индивидуумом, подвергается повышенному риску развития инфекции вируса гриппа. Более того, субъект рискует заразиться инфекцией вируса гриппа из-за близости к вспышке заболевания, например субъект, пребывающий в густонаселенном городе или в непосредственной близости к субъектам, имеющим подтвержденные или предполагаемые инфекции вируса гриппа, или из-за выбора работы, например сотрудник больницы, фармацевт-исследователь, путешественник в зараженную местность или человек, часто осуществляющий перелеты.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "излечение" или "лечение" относятся к снижению или уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфекции вируса гриппа в результате введения терапевтического средства, такого как антитело в соответствии с настоящим изобретением, субъекту при необходимости этого. Данные термины включают в себя ингибирование прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Данные термины также включают в себя положительный прогноз при заболевании, т.е. у субъекта может отсутствовать инфекция, или у него могут быть снижены вирусные титры после введения терапевтического средства, такого как антитело в соответствии с настоящим изобретением. Терапевтическое средство можно вводить субъекту при терапевтической дозе.

Термины "предупреждать", "предупреждающий" или "предупреждение" относятся к подавлению проявления инфекции вируса гриппа или любых симптомов или признаков инфекции вируса гриппа при введении антитела в соответствии с настоящим изобретением. Термин включает в себя предупреждение распространения инфекции у субъекта, который подвергался воздействию вируса или имеет риск возникновения инфекции вируса гриппа.

Используемый в настоящем документе термин "защитный эффект" может быть продемонстрирован какой-либо стандартной известной в уровне техники процедурой для определения того, может ли средство, такое как противовирусное средство, или антитело, такое как антитело против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, продемонстрировать любое одно или несколько из, например, повышение выживаемости после воздействия возбудителя инфекции, снижения вирусной нагрузки или облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с возбудителем инфекции.

Используемый в настоящем документе термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому противоинфекционному лекарственному средству или терапии, используемому для лечения, предупреждения или облегчения вирусной инфекции у субъекта. Термин "противовирусное лекарственное средство" включает в себя без ограничения TAMIFLU® (осельтамивир), RELENZA® (занамивир), рибавирин или интерферон-альфа-2b. В соответствии с настоящим изобретением инфекция, подлежащая лечению, вызывается вирусом гриппа.

#### **Общее описание**

Грипп является инфекционным заболеванием, вызываемым РНК-вирусами из семейства Orthomyxoviridae (вирусы гриппа). Вирусы гриппа классифицируются на основании корового белка на три рода



А, В и С, которые дополнительно разделяются на подтипы, определяемые гликопротеинами вирусной оболочки гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (НА). Вирусы гриппа А инфицируют ряд видов млекопитающих и птиц, тогда как инфекции типа В и С в основном ограничиваются людьми. Только типы А и В вызывают заболевание у людей, вызывающие беспокойство какой-либо степени.

Высокая частота мутаций и частые генетические рекомбинации вирусов гриппа способствуют сильной вариативности антигенов НА и НА. Незначительные точечные мутации, вызывающие небольшие изменения ("антигенный дрейф"), происходят относительно часто. Антигенный дрейф позволяет вирусу ускользать от иммунного распознавания, что приводит к повторным вспышкам гриппа в годы между пандемиями. Большие изменения в антигене НА ("антигенная изменчивость") вызываются рекомбинацией генетического материала из различных подтипов вируса гриппа А. Антигенная изменчивость, приводящая к новым пандемическим штаммам, является редким явлением, возникающим в результате рекомбинации между животными и человеческими подтипами, например у инфицированных разными вирусами свиней.

Ответ нейтрализующих антител на вирус гриппа А, как правило, является специфическим для данного вирусного подтипа. Существует 18 подтипов вируса гриппа А, определяемых их гемагглютининовыми ("НА") белками. 18 НА, Н1-Н18, могут быть разделены на две группы. Группа 1 состоит из подтипов Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17 и Н18, а группа 2 включает в себя подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15. По этим причинам существует острая потребность в вакцине, которая индуцирует широко нейтрализующие антитела, способные нейтрализовать все подтипы вируса гриппа А, а также их ежегодные варианты. Кроме того, широко нейтрализующие антитела различных подтипов могут вводиться в качестве медицинских препаратов для предупреждения или терапии инфекции гриппа А.

НА синтезируется как гомотрехмерный полипептид-предшественник НА0. Каждый мономер может быть независимо расщеплен посттрансляционно с образованием двух полипептидов НА1 и НА2, связанных одной дисульфидной связью. Более крупный N-концевой фрагмент (НА1, 320-330 аминокислот) образует мембрано-дистальный глобулярный домен, который содержит сайт связывания рецептора и большинство детерминант, распознаваемых нейтрализующими вирус антителами. Полипептид НА1 НА отвечает за прикрепление вируса к клеточной поверхности. Меньшая С-концевая часть (НА2, приблизительно 180 аминокислот) образует подобную стеблю структуру, которая заякоривает глобулярный домен в клеточной или вирусной мембране. Полипептид НА2 опосредует слияние вирусных и клеточных мембран в эндосомах, что обеспечивает высвобождение рибонуклеопротеинового комплекса в цитоплазму.

Идентификация антител, которые нейтрализуют более чем один подтип вируса гриппа А, не принесла значительных успехов. Кроме того, нейтрализация идентифицированными таким образом антителами является слишком узкой, а ее эффективность является низкой. Okuno et al. иммунизировали мышей вирусом гриппа А/Okuda/57 (H2N2) и выделяли моноклональное антитело (С179), которое связывается с консервативным конформационным эпитопом в НА2 и нейтрализует подтипы вируса гриппа А Н2, Н1 и Н5 из группы 1 на животных моделях *in vitro* и *in vivo* (Okuno et al., J. Virol. 67: 2552-8, 1993).

Несмотря на исследования, проводимые в течение десятилетий, на рынке не существует антител, которые широко нейтрализуют или ингибируют инфекцию вируса гриппа А или ослабляют заболевание, вызванное вирусом гриппа А. Поэтому необходимо идентифицировать новые антитела, которые нейтрализуют многочисленные подтипы вируса гриппа А и могут быть использованы в качестве медицинских препаратов для предупреждения или терапии инфекции гриппа А.

Пассивная иммунотерапия для профилактики или лечения инфекционных заболеваний используется более ста лет, как правило, в форме сыворотки крови фазы выздоровления человека, которая содержит высокие титры нейтрализующих антител (Good et al. 1991; Cancer 68: 1415-1421). В настоящее время несколько очищенных моноклональных антител находятся в текущей доклинической и клинической разработке для применения в качестве противомикробных средств (Marasco et al. 2007; Nature Biotechnology 25: 1421-1434).

Авторы настоящего изобретения описали в настоящем документе полностью человеческие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемагглютинином вируса гриппа и модулируют взаимодействие вируса гриппа с клетками-хозяевами. Антитела против НА вируса гриппа могут связываться с вирусом гриппа НА с высокой аффинностью. Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением являются блокирующими антителами, при этом антитела могут связываться с НА вируса гриппа и блокировать прикрепление вируса к клеткам-хозяевам и/или входение вируса в клетки-хозяева. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела в соответствии с настоящим изобретением могут блокировать связывание вируса гриппа с клетками и, таким образом, могут ингибировать или нейтрализовать способность вируса инфицировать клетки-хозяева. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела могут быть применимы для лечения субъекта, страдающего инфекцией вируса гриппа. Антитела при введении субъекту при необходимости этого могут снижать инфекцию вируса, такого как грипп, у субъекта. Они могут быть использованы для снижения вирусных нагрузок у субъекта. Они могут быть использованы отдельно или в виде вспомогательной терапии с другими терапевтическими молекулами или методами, известными в уровне техники для лечения вирусной инфекции. Согласно определенным вари-

антам осуществления такие антитела могут связываться с эпитопом в стеблевом участке вирусного НА. Кроме того, идентифицированные антитела могут быть использованы профилактически (до инфицирования) с целью защиты млекопитающего от инфекции или могут быть использованы терапевтически (после установленного инфицирования) с целью облегчения ранее установленной инфекции или с целью облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией.

Полноразмерная аминокислотная последовательность типичного НА вируса гриппа показана в GenBank под номером доступа NC483324.1 (см. SEQ ID NO: 62 в РСТ публикации WO 2010/027818).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением получают из мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный НА вируса гриппа или рекомбинантная форма НА вируса гриппа или его фрагменты, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенно активным фрагментом НА вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела получают из мышей, иммунизированных композицией вакцины против гриппа с последующей бустерной иммунизацией одним или несколькими полученными рекомбинантными путем пептидами НА.

Иммуногеном может быть биологически активный и/или иммуногенный фрагмент НА вируса гриппа или ДНК, кодирующая его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из стеблевого участка белка НА (см. Sui et. al, Nature Struct. and Mol. Biol. Published online 22 Feb. 2009; Pages 1-9).

Пептиды могут быть модифицированы с включением добавления или замены определенных остатков с целью мечения или с целью конъюгации с молекулами-носителями, такими как KLH. Например, цистеин может быть добавлен либо на N-конец, либо на C-конец пептида, или линкерная последовательность может быть добавлена при получении пептида для конъюгации, например, с KLH, с целью иммунизации.

Некоторые антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением способны связываться с НА вируса гриппа и нейтрализовать его активность, как определено с помощью *in vitro* или *in vivo* анализов. Способность антител в соответствии с настоящим изобретением связываться с НА вируса гриппа и нейтрализовать его активность и, таким образом, прикрепление к клетке-хозяину и/или вхождение вируса в клетку-хозяина с последующей вирусной инфекцией может быть измерена с использованием какого-либо стандартного способа, известного специалисту в данной области, в том числе анализы связывания или анализы активности, описываемые в настоящем документе.

Неограничивающие типичные *in vitro* анализы для измерения активности связывания показаны в примере 3 настоящего документа. В примере 3 аффинность связывания и константы диссоциации антител против НА вируса гриппа для НА вируса гриппа определяли с помощью биосенсора на основе интерферометра в биослое в режиме реального времени (анализ Octet HTX). В примерах 4 и 5 анализы нейтрализации использовали для определения способности инфицирования различных штаммов группы 1 вируса гриппа. В примере 6 было показано, что некоторые антитела опосредуют зависимость от комплемента цитотоксичность (CDC) инфицированных вирусом клеток *in vitro*. В примерах 7 и 10 демонстрируется, что некоторые антитела в соответствии с настоящим изобретением способны нейтрализовать инфекцию гриппа А *in vivo* при введении либо профилактически, либо терапевтически.

Антитела, специфические в отношении НА вируса гриппа, могут не содержать дополнительные метки или фрагменты или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления меткой или фрагментом является биотин. В анализе связывания расположение метки (если имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой пептид связывается. Например, если поверхность покрывают авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован так, что C-концевая часть пептида будет дистальной по отношению к поверхности. Согласно одному варианту осуществления меткой может быть радионуклид, флуоресцентный краситель или выявляемая с помощью MRI метка. Согласно определенным вариантам осуществления такие меченые антитела могут быть использованы в диагностических анализах, в том числе в визуализирующих анализах.

Антигенсвязывающие фрагменты антител.

Если конкретно не указано иное, используемый в настоящем документе термин "антитело" следует понимать как охватывающий молекулы антитела, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (т.е. "молекулы полного антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины "связывающая антиген часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. предусматривают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с НА вируса гриппа. Фрагмент антитела может включать в себя Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту мультиспецифической связывающей антиген молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты

антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, предусматривающих манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антител, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотек "фаг-антитело") или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции при помощи методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, присоединения или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарный участок (CDR), такой как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетраатела, минитела, нанотела (например, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т.д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который прилегает к рамке считывания или находится в таковой с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V<sub>H</sub>, связанный с доменом V<sub>L</sub>, домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменный участок может быть димерным 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>. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие типичные конфигурации переменного и константного доменов, которые могут быть найдены в антигенсвязывающем фрагменте антитела в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя: (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 переменных и константных доменов, в том числе в любых из типичных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны при помощи целого или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций переменных и константных доменов, приведенных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> (например, при помощи дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае с молекулами полного антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же антигена. Любой формат мультиспецифических антител, в том числе форматы типичных биспецифических антител, раскрываемых в настоящем документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением с использованием стандартных методик, доступных из уровня техники.

Получение человеческих антител.

Способы создания человеческих антител у трансгенных мышей известны в уровне техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с НА вируса гриппа. Для создания антител против НА вируса гриппа может быть использован иммуноген, представляющий собой любой из следующих. Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением получают у мышей, иммунизированных полноразмерным нативным НА вируса гриппа (см.,

например, номер доступа FJ966082.1 в GenBank), или живым аттенуированным или инактивированным вирусом, или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. В качестве альтернативы, белок НА вируса гриппа или его фрагмент может быть получен с использованием стандартных биохимических методик, модифицирован и использован в качестве иммуногена. Согласно одному варианту осуществления иммуногеном является рекомбинантно полученный белок НА вируса гриппа или его фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения иммуногеном может быть вакцина вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления могут быть введены одна или несколько бустерных инъекций. Согласно определенным вариантам осуществления бустерные инъекции могут содержать один или несколько штаммов вируса гриппа или гемагглютинины, полученные из этих штаммов, см., например, Protein Sciences H1 A/New Caledonia/20/1999, H5 A/Indonesia/05/2005, H3 A/Victoria/361/2011, H7 A/Netherlands/219/2003 или H9 A/Hong Kong/1073/1988. Согласно определенным вариантам осуществления бустерные инъекции могут содержать смесь 1:1 штаммов вируса гриппа или смесь 1:1 гемагглютининов, полученных из этих штаммов. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногеном может быть рекомбинантный пептид НА вируса гриппа, экспрессированный в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO), или сам вирус гриппа.

С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител химерные антитела против НА вируса гриппа с высокой аффинностью исходно выделяют с использованием человеческого переменного участка и мышинного константного участка. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши с геномом, содержащим переменные участки человеческих тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными мышинными локусами константного участка так, что мышь продуцирует антитело, содержащее человеческий переменный участок и мышинный константный участок в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные участки человеческих тяжелой и легкой цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полное человеческое антитело.

Как правило, мышь, полученную при помощи VELOCIMMUNE®, подвергают воздействию представляющего интерес антигена, и из мышей, которые экспрессируют антитела, извлекают лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки можно подвергать слиянию с линией клеток миеломы с получением линий immortalized клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы исследуют и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующая переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с константными участками требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующая антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Сначала выделяют химерные антитела с высокой аффинностью, имеющие человеческий переменный участок и мышинный константный участок. Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Мышинные константные участки заменяют требуемыми человеческими константными участками с получением полностью человеческого антитела в соответствии с настоящим изобретением, например IgG1 или IgG4, дикого типа или модифицированные. В то время как выбранный константный участок может варьировать в зависимости от конкретного применения, в переменном участке сохраняются характеристики связывания с антигеном с высокой аффинностью или специфичностью к мишеням.

#### Биоэквиваленты.

Антитела против НА вируса гриппа и фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать НА вируса гриппа. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описываемых антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело в соответствии с настоящим изобретением, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые, по сути, являются биоэквивалентами антитела или фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считают биоэквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или

степень абсорбции которых значительно не отличается от таких показателей при введении одинаковой молярной дозы в аналогичных экспериментальных условиях, либо однократной дозы, либо нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентами по их степени всасывания, но не по их скорости абсорбции, и все равно могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции предусматривают и учитывают при введении метки, и не являются существенными для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, например, при длительном применении, а также считаются несущественными с медицинской точки зрения для конкретного изучаемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если пациент может быть переведен один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с длительной терапией без такого перевода.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия в отношении условия или условий применения в том объеме, в котором таким механизмы известны.

Биоэквивалентность можно выявить при помощи *in vivo* и/или *in vitro* способов. Измерения биоэквивалентности предусматривают, например, (a) *in vivo* тестирование у людей или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в зависимости от времени; (b) *in vitro* тестирование, которое коррелировало с данными *in vivo* тестирования биодоступности у человека и обосновано прогнозировало их; (c) *in vivo* тестирование у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его цели) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антитела в соответствии с настоящим изобретением можно сконструировать при помощи, например, создания разных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся значимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антитела, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например мутации, которые устраняют или исключают гликозилирование.

Антитела против НА вируса гриппа, содержащие Fc-варианты.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения представлены антитела против НА вируса гриппа, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение относится к антителам против НА вируса гриппа, содержащим мутацию в C<sub>H</sub>2- или C<sub>H</sub>3-участке Fc-домена, где мутация(ии) увеличивают аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полувыведения антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких Fc-модификаций включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает 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, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно другому варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение относится к антителам против НА вируса гриппа, содержащим Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомяну-

тых мутаций в Fc-домене и другие мутации в пределах вариабельных доменов антитела, раскрываемых в настоящем документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к антителам против НА вируса гриппа, содержащим химерный константный участок ( $C_H$ ) тяжелой цепи, при этом химерный участок  $C_H$  содержит сегменты, полученные из участков  $C_H$  более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать химерный участок  $C_H$ , содержащий часть домена  $C_{H2}$  или весь этот домен, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью домена  $C_{H3}$  или всем этим доменом, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат химерный участок  $C_H$  с химерным шарнирным участком. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки положений 216-227 согласно нумерации по EU), полученную из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки положений 228-236 согласно нумерации по EU), полученной из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления химерный шарнирный участок содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерный участок  $C_H$ , описанный в настоящем документе, согласно определенным вариантам осуществления может проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела (см., например, предварительную заявку на выдачу патента США 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г.).

Биологические характеристики антител.

В целом, антитела в соответствии с настоящим изобретением функционируют путем связывания с НА вируса гриппа. Например, настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают НА вируса гриппа (например, при 25°C или при 37°C) с  $K_D$  менее 10 нМ, что измерено с помощью биосенсора на основе интерферометра в биослое в режиме реального времени (анализ Octet HTX) или с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают НА вируса гриппа с  $K_D$  менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 500 пМ, менее 250 пМ или менее 100 пМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают НА вируса гриппа с полупериодом диссоциации ( $t^{1/2}$ ) более приблизительно 100 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, описанного в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением связывают НА вируса гриппа с  $t^{1/2}$  более приблизительно 200, более приблизительно 300, более приблизительно 400, более приблизительно 500, более приблизительно 600, более приблизительно 700, более приблизительно 800, более приблизительно 900 или более приблизительно 1000 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, определяемого в настоящем документе (например, формата ловушки mAb или ловушки антигена), или в значительной степени подобного анализа. Согласно одному варианту осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением связывают НА вируса гриппа с полупериодом диссоциации ( $t^{1/2}$ ) более 300 мин. Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает приблизительно 1,5-2-кратное повышение полупериода диссоциации по сравнению с антителом сравнения, называемым MAб контроля I, при тестировании у обезьян и мышей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые нейтрализуют способность вируса гриппа инфицировать их клетки-хозяева. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела проявляют нейтрализующую активность в отношении различных типичных вирусов гриппа группы 1 (H1N1 A/Puerto Rico/08/1934; H5N1 A/Vietnam/1203/2004; H1N1 A/California/07/2009; H1N1 A/Wisconsin/1933; H1N1 A/Brisbane/59/1997, H9N2 A/Hong Kong/33982/2009, H13N6 a/gull/Maryland/704/1977 и H16N3 A/shorebird/Delaware/172/2006) с  $IC_{50}$ , варьирующей от приблизительно 1,6 до приблизительно 130 нМ, в анализе микронейтрализации, например, как показано в примерах 4 и 5 или в значительной степени подобном анализе. Согласно одному варианту осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые нейтрализуют способность вируса гриппа инфицировать их клетки-хозяева, делают это с  $IC_{50}$  менее 130 нМ.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые опосредуют зависимость от комплемента цитотоксичность инфицированных клеток с  $EC_{50}$ , варьирующей от приблизительно 20 до приблизительно 66 нМ (см. пример 6). Согласно одному варианту осу-

ществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты опосредуют зависимость от комплемента цитотоксичность инфицированных клеток с  $EC_{50}$  менее 66 нМ.

Настоящее изобретение также относится к антителам против HA вируса гриппа А, которые демонстрируют усиление защиты или эффективную нейтрализацию инфекции гриппа А *in vivo*. Некоторые антитела демонстрируют эффективную нейтрализацию при введении либо профилактически (до инфицирования), либо терапевтически (после инфицирования; см. пример 7). Согласно определенным вариантам осуществления некоторые из антител (H1N11729P и H1N11829N2) демонстрировали 100% выживаемость мышей при введении профилактически в виде однократной дозы 1 мг/кг. Некоторые антитела демонстрировали значительную выживаемость мышей при введении профилактически дозами всего лишь 0,5 мг/кг (100% выживаемость с использованием антитела, называемого H1N11729P), при 0,1 мг/кг H1N11729P (40% выживаемость) или при 0,05 мг/кг H1N11829N2 (20% выживаемость). Значительную выживаемость также наблюдали при введении некоторых типичных антител (H1N11829N2 и H1N11729P) после инфицирования дозами 15 или 30 мг/кг. Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует аддитивный защитный эффект у инфицированных гриппом млекопитающих при объединении с противовирусным лекарственным средством осельтамивиром.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с HA вируса гриппа, при этом антитело или его фрагмент проявляет две или более из следующих характеристик: (а) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с HA вируса гриппа с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-9}$  М, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (с) демонстрирует полупериод диссоциации ( $t^{1/2}$ ), варьирующей от приблизительно 370 мин до более 1000 мин; (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов гриппа А группы 1, выбранных из H1N1, H5N1, H9N2, H13N6 и H16N3, с  $IC_{50}$ , варьирующей от приблизительно 1,6 до приблизительно 130 нМ; (е) демонстрирует опосредованный комплементом лизис инфицированных вирусом гриппа клеток с  $EC_{50}$  от приблизительно 20 до приблизительно 66 нМ или (f) демонстрирует защиту, как измерено с помощью повышения выживаемости на животной модели инфекции вируса гриппа, при введении либо до, либо после заражения вирусом.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут обладать двумя или более из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител в соответствии с настоящим изобретением будут очевидны специалисту в данной области из обзора настоящего раскрытия, в том числе из практических примеров настоящего документа.

Эпитопное картирование и родственные технологии.

Настоящее изобретение относится к антителам против HA вируса гриппа, которые взаимодействуют с одним или несколькими аминокислотными остатками, обнаруженными в пределах одного или нескольких доменов молекулы HA вируса гриппа. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной 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, расположенных в молекуле HA вируса гриппа (например, линейный эпитоп в домене). В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества не непрерывных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в молекуле HA вируса гриппа (например, конформационный эпитоп).

Разные методики, известные специалисту в данной области, можно использовать для определения наличия "взаимодействия с одной или несколькими аминокислотами" антитела в пределах полипептида или белка. Типичные методики включают в себя, например, стандартные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы предусматривают аланин-сканирующий мутационный анализ, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстрагирование эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый при помощи масс-спектрометрии. В общих чертах, водородно-дейтериевый обмен предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченным дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обмену дейтерия на водород с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности взаимодействия. Как результат, аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, характеризоваться относительно более высокой массой по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, выявляя тем самым остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело (см., например, Ehring (1999) *Antibodies*).

alytical Biochemistry 267: 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A).

Термин "эпитоп" относится к сайту в антигене, на который отвечают В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут образовываться как из непрерывных аминокислот, так и из непрерывных аминокислот, сближенных за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные непрерывными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные посредством укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Анализ профиля с модификацией (MAP), также известный как анализ профиля антител с модификацией структуры антигена (ASAP), представляет собой способ распределения по группам больших количеств моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, исходя из подобия профилей связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. US 2004/0101920). Каждой категории может соответствовать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного в другой категории, либо частично перекрывается с ним. Данная технология обеспечивает возможность быстрого отбора генетически идентичных антител с тем, чтобы характеристику можно было сосредоточить на генетически отличающихся антителах. При использовании в отношении скрининга гибридомы MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридомы, которые продуцируют mAb с требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител в соответствии с настоящим изобретением в группы антител, связывающих разные эпитопы.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела против НА вируса гриппа или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любого одного или нескольких участков, представленных в НА вируса гриппа, либо в его природной форме, либо полученного рекомбинантно, или в его фрагменте.

Настоящее изобретение относится к антителам против НА вируса гриппа, которые связываются с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа. Подобным образом, настоящее изобретение также относится к антителам против НА вируса гриппа, которые конкурируют за связывание с НА вируса гриппа или его фрагментом с любым из специфических типичных антител, описываемых в настоящем документе. Например, настоящее изобретение относится к антителам против НА вируса гриппа, которые перекрестно конкурируют за связывание с НА вируса гриппа с одним или несколькими антителами, полученными из тех антител, которые описаны в табл. 1 и 12.

Используя стандартные способы, известные в уровне техники, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против НА вируса гриппа, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивают возможность связывания эталонного антитела с НА вируса гриппа или пептидом при насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой НА вируса гриппа. Если тестируемое антитело способно связываться с НА вируса гриппа после насыщающего связывания с эталонным антителом против НА вируса гриппа, то можно сделать вывод о том, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается эталонное антитело против НА вируса гриппа. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с НА вируса гриппа после насыщающего связывания с эталонным антителом против НА вируса гриппа, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением.

Для определения того, имеет ли место конкуренция за связывание с эталонным антителом против НА вируса гриппа, описанную выше методику исследования связывания осуществляют в двух направлениях: в первом направлении обеспечивают возможность связывания эталонного антитела с НА вируса гриппа при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой НА вируса гриппа. Во втором направлении обеспечивают возможность связывания тестируемого антитела с молекулой НА вируса гриппа при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой НА вируса гриппа. Если в обоих направлениях только первое (насыщающие условия) антитело способно к связыванию с молекулой НА вируса гриппа, то делают заключение, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с НА вируса гриппа. Специалисту в данной области будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может необязательно связываться с идентичным эпитопом, что и эталонное антитело, но может пространственно блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или прилегающего эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание других с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание других по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, что измерено в анализе конкурентного связывания (смотри, например, Junghans



et al., *Cancer Res.* 1990 50: 1495-1502). В качестве альтернативы, в двух антителах присутствует одинаковый эпитоп, если, по сути, все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого антитела. В двух антителах присутствует перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого антитела.

Дополнительные стандартные эксперименты (например, анализы мутаций в пептидах и связывания) затем можно осуществлять для подтверждения того, обусловлен ли факт наблюдаемого отсутствия связывания тестируемого антитела связыванием с одним и тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или пространственное блокирование (или другое явление) несет ответственность за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно проводить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, известного в уровне техники.

Иммуноконъюгаты.

Настоящее изобретение охватывает человеческое моноклональное антитело против НА вируса гриппа, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгатом"), таким как анатоксин или противовирусное лекарственное средство для лечения инфекции вируса гриппа. Используемый в настоящем документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химическим или биологическим способом связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом, или белком, или терапевтическим средством. Антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом, или белком, или терапевтическим средством в любом месте по всей длине молекулы, которая является настолько длинной, что они способны связываться со своей целью. Примеры иммуноконъюгатов включают в себя конъюгаты антитела и лекарственного средства, а также белки слияния антитело-токсин. Согласно одному варианту осуществления средство может представлять собой второе отличающееся антитело против НА вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления антитело может быть конъюгировано со средством, которое является специфическим по отношению к клеткам, инфицированным вирусом. При выборе типа терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом против НА вируса гриппа, принимают во внимание подлежащее лечению состояние и достигаемый требуемый терапевтический эффект. Из уровня техники известны примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов; см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного целевого полипептида (см., например, Tutt et al, 1991, *J. Immunol.* 147: 60-69; Kufer et al, 2004, *Trends Biotechnol.* 22: 238-244).

Любые из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул в соответствии с настоящим изобретением или их вариантов можно сконструировать с использованием стандартных методик молекулярной биологии (например, технологии рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, специфические к НА вируса гриппа, получают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные участки, связывающиеся с отличающимися доменами НА вируса гриппа, соединяются вместе для придания двухдоменной специфичности одной связывающей молекуле. Соответственно полученные свойства биспецифичности могут усиливать общую ингибиторную эффективность по отношению к белку НА вируса гриппа посредством усиления как специфичности, так и авидности связывания. Переменные участки со специфичностью к отдельным доменам (например, сегменты N-концевого домена) или те, которые могут связываться с разными участками в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждому участку одновременно связываться с отдельными эпитопами, или с разными участками в пределах одного домена. В одном примере для обеспечения биспецифичности переменные участки тяжелой цепи ( $V_H$ ) из связывающей молекулы со специфичностью к одному домену подвергают рекомбинации с переменными участками легкой цепи ( $V_L$ ) из ряда связывающих молекул со специфичностью ко второму домену для идентификации неродственных партнеров  $V_L$ , которые можно объединять в пару с исходным  $V_H$  без нарушения первоначальной специфичности  $V_H$ . Таким же способом можно объединять отдельный сегмент  $V_L$  (например,  $V_{L1}$ ) с двумя разными доменами  $V_H$  (например,  $V_{H1}$  и  $V_{H2}$ ) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих "плечей" ( $V_{H1}$ - $V_{L1}$  и  $V_{H2}$ - $V_{L1}$ ). Применение отдельного сегмента  $V_L$  снижает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN 13/022759 и US 2010/0331527).

В качестве альтернативы, антитела, которые связывают более чем один домен и вторую цель, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело против НА вируса гриппа, можно полу-

чать в биспецифическом формате с использованием описанных в настоящем документе методик или других методик, известных специалисту в данной области. Варибельные участки антител, связывающиеся с отличающимися участками, можно соединять вместе с варибельными участками, которые связываются с соответствующими сайтами, например, на вирусе гриппа, для обеспечения двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Надлежащим образом сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Варибельные участки со специфичностью к внеклеточному домену комбинируют с варибельным участком со специфичностью к внеклеточному домену и объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждому варибельному участку связываться с отдельными антигенами.

Типичное антитело в биспецифическом формате, которое можно использовать в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение C<sub>H</sub>3-домена первого иммуноглобулина (Ig) и C<sub>H</sub>3-домена второго иммуноглобулина Ig, при этом C<sub>H</sub>3-домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом различие по меньшей мере в одну аминокислоту уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует различие по аминокислотам. Согласно одному варианту осуществления C<sub>H</sub>3-домен первого Ig связывает белок А, а C<sub>H</sub>3-домен второго Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка А, такую как модификация Н95R (нумерация экзонов согласно IMGT; Н435R нумерация согласно EU). Вторым C<sub>H</sub>3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C<sub>H</sub>3, включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае с антителами IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае с антителами IgG2; а также Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае с антителами IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Другие типичные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной варибельный домен (DVD)-Ig, квадруму, выступы-во-впадины, обычную легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-тело, лейциновую застежку, DuoBody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab<sup>2</sup> биспецифические форматы (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4: 6, 1-11, и источники, упоминаемые в этом документе, для обзора вышеизложенных форматов). Биспецифические антитела также можно сконструировать при помощи конъюгации пептидов/нуклеиновых кислот, например, если не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой (см., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы.

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела против НА вируса гриппа или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном многим химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие (катионные или анионные) липиды пузырьки (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс (см. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311).

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. При использовании антитела в соответствии с настоящим изобретением для лечения у пациента-взрослого заболевания или нарушения или для предупреждения заболевания преимущественным является введение антитела в соответствии с настоящим изобретением, как правило, в однократной дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 60 мг/кг массы тела, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг массы тела или от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно регулировать. Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены в виде начальной дозы по меньшей мере от приблизительно 0,1 до приблизительно 5000 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 10

до приблизительно 500 мг, до приблизительно 100 или до приблизительно 50 мг. Согласно определенным вариантам осуществления после начальной дозы может следовать введение второй дозы или нескольких последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно равным начальной дозе или меньше начальной дозы, при этом последующие дозы разделены интервалом по меньшей мере от 1 дня до 3 суток; по меньшей мере в одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, например инкапсулирование 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 предусматривают без ограничения внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутривенный, интравенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.), а также ее можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности в липосоме (см., например, Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533).

Применение наночастиц для доставки антител в соответствии с настоящим изобретением также предусматривается в настоящем документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических применений. Наночастицы, конъюгированные с антителами, и способы их получения и применения подробно описаны у Arguebo, M., et al., 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящий документ посредством ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен в настоящий документ во всей своей полноте.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос. Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы. Согласно другому варианту осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи от цели для композиции, таким образом, требуется лишь часть системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, интракраниальных, внутривенных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты можно получать при помощи известных способов. Например, инъекционные препараты можно получать, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. Водная среда для инъекций представляет собой, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.п., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксипропиленовый (50 молей) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученным таким способом инъекционным составом предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки при доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением широко используется устройство для доставки в виде шприца-ручки. Такое устройство для доставки в виде шприца-ручки может быть многократного и однократного использования. В устройстве для доставки в виде шприца-ручки многократного использования, как правило, используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция в картридже была введена, и картридж опустел, пустой картридж можно легко утилизировать и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство для доставки в виде шприца-ручки можно использовать повторно. В устройстве для доставки в виде шприца-ручки однократного использования заменяемый картридж отсутствует. Вместо этого устройство для доставки в виде шприца-ручки однократного использования выпускают предварительно наполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре устройства. После того как резервуар опорожняют от

фармацевтической композиции, все устройство утилизируют.

Многочисленные устройства для доставки в виде шприца-ручки или автоинъектора многоразового использования используются при подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Примеры включают в себя, разумеется без ограничения, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, 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), при этом упомянуты лишь несколько из них. Примеры устройств для доставки в виде шприца-ручки многоразового использования, используемых при подкожном введении фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя, разумеется без ограничения, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), при этом упомянуты лишь несколько из них.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в лекарственных формах в стандартной дозе, подходящей для подбора дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в виде стандартной дозы включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные формы (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 5000 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы содержание антитела для других лекарственных форм составляло от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг.

Терапевтическое применение антител.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения и/или предупреждения заболевания, или нарушения, или состояния, ассоциированных с инфекцией вируса гриппа, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения субъектов, страдающих тяжелой и острой респираторной инфекцией, вызываемой вирусом гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы при уменьшении вирусных титров или снижении вирусной нагрузки у хозяина. Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены в терапевтической дозе пациенту с инфекцией вируса гриппа.

Одно или несколько антител в соответствии с настоящим изобретением можно вводить для ослабления, или предупреждения, или снижения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или нарушения. Антитела можно использовать для облегчения или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа, в том числе без ограничения лихорадки, кашля, боли в горле, головной боли, боли во всем теле, утомления, сильного истощения, затруднения дыхания, бронхита, пневмонии и смерти.

В настоящем документе также предусматривается применение одного или нескольких антител в соответствии с настоящим изобретением с профилактической целью для субъектов с риском развития инфекции вируса гриппа, таких как индивидуумы с ослабленным иммунитетом, пожилые люди (возрастом старше 65 лет), дети возрастом младше 2 лет, работники здравоохранения, члены семьи, находящиеся рядом с пациентом, страдающим инфекцией вируса гриппа, а также пациенты, имеющие нарушения в анамнезе (например, повышенный риск легочной инфекции, заболевание сердца или сахарный диабет).

Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения данные антитела используют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции вируса гриппа. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения данные антитела используют в качестве вспомогательной терапии с любым другим средством или любой другой терапией, известной специалисту в данной области, применимой для лечения или облегчения инфекции вируса гриппа.

Комбинированные терапевтические средства.

Комбинированные терапевтические средства могут включать в себя антитело против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно успешно объединять с антителом в соответствии с настоящим изобретением или с биологически активным фрагментом антитела в соответствии с настоящим изобретением. Антитела в соответствии с настоящим изобретением можно синергически объединять с одним или несколькими лекарственными средствами или средствами (например, противовирусными средствами), используемыми для

лечения гриппа.

Например, типичные противовирусные средства включают в себя, например, вакцины, ингибиторы нейраминидазы или нуклеозидные аналоги. Другие типичные противовирусные средства, которые могут быть использованы в комбинации с антителом в соответствии с настоящим изобретением, могут включать в себя, например, зидовудин, ганцикловир, видарабин, идоксуридин, трифлуридин, фоскарнет, ацикловир, рибавирин, амантадин, ремантидин, саквинавир, индинавир, ритонавир, альфа-интерфероны и другие интерфероны, ингибитор нейраминидазы (например, занамивир (RELENZA®), осельтамивир (TAMIFLU®) ланинамивир, перамивир или римантадин.

Другие типичные противовирусные лекарственные средства включают в себя без ограничения ингибитор НА, ингибитор сиаловой кислоты и ингибитор ионного канала М2. Согласно одному варианту осуществления ингибитором ионного канала М2 является амантадин или римантадин.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть объединены со вторым терапевтическим средством для снижения вирусной нагрузки у пациента с инфекцией вируса гриппа или для облегчения одного или нескольких симптомов инфекции.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в комбинации с противовоспалительным лекарственным средством (например, с кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), устраняющим застойные явления средством, противогистаминным средством, противоионным лекарственным средством, другим антителом против вируса гриппа, противовирусным лекарственным средством, вакциной против вируса гриппа, такой как FLUMIST® или FLUVIRIN®, пищевой добавкой, такой как антиоксиданты, или любым другим паллиативным терапевтическим средством для лечения инфекции вируса гриппа.

Согласно определенным вариантам осуществления вторым терапевтическим средством является другое антитело против вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления вторым терапевтическим средством является другое антитело против гемагглютинина вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления вторым терапевтическим средством является другое антитело против другого белка вируса гриппа, такого как нейраминидаза или тетрамерный эктодомен матричного белка 2 (белка М2е). Согласно определенным вариантам осуществления вторым терапевтическим средством является антитело против другого белка, такого как трансмембранная протеаза хозяина, серин 2 (TMPRSS2). Второе антитело может быть специфическим по отношению к одному или нескольким разным белкам вируса гриппа из разных подтипов или штаммов вируса. В настоящем документе предусматривается применение комбинации ("коктейля") антител с широкой нейтрализующей или ингибиторной активностью против вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления неконкурирующие антитела могут быть объединены и введены субъекту при необходимости этого для снижения способности вируса гриппа ускользать посредством быстрой мутации от давления отбора. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, содержащиеся в комбинации, связываются с разными неперекрывающимися эпитопами в белке НА. Антитела, содержащиеся в комбинации, могут блокировать прикрепление вируса к клеткам-хозяевам, и/или вхождение в таковые, и/или слияние с таковыми. Антитела могут взаимодействовать с гемагглютинином, выбранным из любого одного или нескольких подтипов вируса гриппа А группы 1, в том числе Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17 или Н18, и при использовании отдельно или в комбинации с любым одним или несколькими из средств, отмеченных выше, могут нейтрализовать любой один или несколько из подтипов вируса гриппа группы 1, в том числе без ограничения следующие: Н1Н1, Н5Н1, Н9Н2, Н13Н6 и Н16Н3.

Также в настоящем документе предусматривается применение комбинации антител против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, при этом комбинация содержит одно или несколько антител, которые не конкурируют перекрестно. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация включает в себя первое антитело с широким спектром нейтрализующей активности и второе антитело с активностью против узкого спектра изолятов, и это антитело не конкурирует перекрестно с первым антителом.

Используемый в настоящем документе термин "в комбинации с" означает, что дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить до введения, одновременно с ним или после введения антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Термин "в комбинации с" также предусматривает последовательное или совместное введение антитела против НА вируса гриппа и второго терапевтического средства.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) может быть введен субъекту до введения антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Например, первый компонент может считаться введенным "до" второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 ч до, за 60 ч до, за 48 ч до, за 36 ч до, за 24 ч до, за 12 ч до, за 6 ч до, за 5 ч до, за 4 ч до, за 3 ч до, за 2 ч до, за 1 ч до, за 30 мин до, за 15 мин до, за 10 мин до, за 5 мин до или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Например, первый компонент может считаться введенным

"после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, через 5 мин после, через 10 мин после, через 15 мин после, через 30 мин после, через 1 ч после, через 2 ч после, через 3 ч после, через 4 ч после, через 5 ч после, через 6 ч после, через 12 ч после, через 24 ч после, через 36 ч после, через 48 ч после, через 60 ч после, через 72 ч после введения второго компонента. Согласно следующим вариантам осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Термин "одновременное" введение для целей настоящего изобретения предусматривает, например, введение антитела против НА вируса гриппа и дополнительного терапевтически активного компонента в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 мин или меньше относительно друг друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждая лекарственная форма может быть введена посредством одного и того же пути (например, как антитело против НА вируса гриппа, так и дополнительный терапевтически активный компонент могут быть введены внутривенно и т.д.); в качестве альтернативы, каждая лекарственная форма может быть введена разными путями (например, антитело против НА вируса гриппа может быть введено внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен перорально). Так или иначе, все введения компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах разными путями считаются "одновременным введением" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия введение антитела против НА вируса гриппа "до", "одновременно с" или "после" (как эти термины определены в настоящем документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением антитела против НА вируса гриппа "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антитело против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением составляют с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, как описывается в другом месте настоящего документа.

Режимы введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления однократная доза антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела против НА вируса гриппа и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упоминаемых в настоящем документе) может быть введена субъекту при необходимости этого. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела против НА вируса гриппа (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела против НА вируса гриппа и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упоминаемых в настоящем документе) могут быть введены субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела против НА вируса гриппа вводят субъекту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела против НА вируса гриппа, затем одной или нескольких вторичных доз антитела против НА вируса гриппа, а затем необязательно одной или нескольких третичных доз антитела против НА вируса гриппа.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (также называемая "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; а "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальных, вторичных и третичных доз могут содержать одинаковое количество антитела против НА вируса гриппа, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Согласно определенным вариантам осуществления, однако, количество антитела против НА вируса гриппа, содержащегося в начальных, вторичных и/или третичных дозах, отличается друг от друга (например, при необходимости регулируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале режима лечения в виде "ударных доз", затем последующие дозы вводят с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

Согласно некоторым типичным вариантам осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-48 ч (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или больше) после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в данном документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности из нескольких введений дозу антитела против НА вируса гриппа,

которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных введений доз.

Способы согласно аспекту настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела против НА вируса гриппа. Например, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных дозы. Подобным образом, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных дозы.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать в ходе режима лечения. Частоту введения может регулировать врач в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Диагностические применения антител.

Антитела против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для выявления и/или измерения НА вируса гриппа в образце, например, для диагностических целей. Согласно некоторым вариантам осуществления предусматривается применение одного или нескольких антител в соответствии с настоящим изобретением в анализах для выявления заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Типичные диагностические анализы для НА вируса гриппа могут предусматривать, например, приведение полученного от пациента образца в контакт с антителом против НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, при этом антитело против НА вируса гриппа метят выявляемой меткой или молекулой-репортером или используют в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения НА вируса гриппа из образцов пациента. В качестве альтернативы, немеченое антитело против НА вируса гриппа можно использовать для диагностических применений в комбинации со вторым антителом, которое само по себе является меченым с возможностью его выявления. Выявляемая метка или молекула-репортер может представлять собой радиоизотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типичные анализы, которые можно использовать для выявления или измерения НА вируса гриппа в образце, предусматривают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах НА вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя образец любой ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит выявляемые количества либо НА вируса гриппа, либо его фрагментов, в нормальном или патологическом состояниях. Как правило, уровни НА вируса гриппа в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием, ассоциированным с гриппом), можно измерять для начального установления исходного уровня или стандартного уровня НА вируса гриппа. Затем этот исходный уровень НА вируса гриппа можно сравнивать с уровнями НА вируса гриппа, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на ассоциированное с НА вируса гриппа состояние или с симптомами, ассоциированными с таким состоянием.

Антитела, специфические по отношению к НА вируса гриппа, могут не содержать дополнительные метки или фрагменты, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связывается пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий биотин на N-конце, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности.

### Примеры

Следующие примеры изложены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции в соответствии с настоящим изобретением, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), однако, необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно  $25^{\circ}\text{C}$ , а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Создание человеческих антител против НА вируса гриппа.

Человеческие антитела против НА вируса гриппа создавали с использованием мыши VELOCIMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую переменные участки тяжелой цепи и легкой каппа-цепи им-

муноглобулина человека. Мышей иммунизировали композицией вакцины против гриппа с последующей бустерной дозой, содержащей смесь пяти различных рекомбинантных гемагглютининовых белков при отношении 1:1 каждого. Пять рекомбинантных гемагглютининовых белков, содержащихся в бустерной дозе, представляли собой гемагглютинины из H1 A/New Caledonia/20/1999, H5 A/Indonesia/05/2005, H3 A/Victoria/361/2011, H7 A/Netherlands/219/2003 и H9 A/Hong Kong/1073/1988 (Protein Sciences, по каталогу 3006). Антительный иммунный ответ контролировали с помощью иммунологического анализа, специфического для HA вируса гриппа А. При достижении требуемого иммунного ответа собирали спленоциты и подвергали их слиянию с клетками мышины миеломы для сохранения их жизнеспособности и образования линий клеток гибридомы. Проводили скрининг и отбор линий клеток гибридомы для идентификации линий клеток, которые продуцировали антитела, специфичные по отношению к HA вируса гриппа. С использованием данной методики и различных иммуногенов, описываемых выше, получали несколько химерных антител (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и мышинные константные домены); типичные антитела, созданные таким путем, называли H1N11820N, H1N11829N, H1N11829N2, H2M11830N, H1N11830N, H1N11903N и H1N14571N.

Антитела против HA вируса гриппа также выделяли непосредственно из антиген-положительных мышинных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298. С использованием данного способа получали несколько полностью человеческих антител против HA вируса гриппа (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и человеческие константные домены); типичные антитела, созданные таким путем, называли H1N11723P, H1N11729P, H1N11704P, H1N11711P, H1N11714P, H1N11717P, H1N11724P, H1N11727P, H1N11730P, H1N11731P2, H1N11734P2, H1N11736P2, H1N11742P2, H1N11744P2, H1N11745P2, H1N11747P2, H1N11748P2.

Биологические свойства типичных антител, полученных в соответствии со способами данного примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 изложены идентификационные номера аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой и легкой цепей и CDR отобранных антител против HA вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие идентификационные номера последовательностей нуклеиновых кислот изложены в табл. 2.

Таблица 1  
Идентификационные номера аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1N11723P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1N11729P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1N11820N	34	36	38	40	42	44	46	48
H1N11829N	50	52	54	56	58	60	62	64
H1N11829N2	50	52	54	56	66	68	70	72
H2aM11829N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M11830N	74	76	78	80	82	84	86	88
H1N11830N2	74	76	78	80	66	68	70	72
H1N11903N	90	92	94	96	98	100	102	104
H1N14571N	106	108	110	112	114	116	118	120
H2a14571N	106	108	110	112	114	116	118	120
H1N11704P	122	124	126	128	130	132	134	136
H1N11711P	138	140	142	144	146	148	150	152
H1N11714P	154	156	158	160	162	164	166	168
H1N11717P	170	172	174	176	178	180	182	184
H1N11724P	186	188	190	192	194	196	198	200
H1N11727P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1N11730P2	218	220	222	224	226	228	230	232
H1N11731P2	234	236	238	240	66	68	70	72
H1N11734P2	242	244	246	248	66	68	70	72
H1N11736P2	250	252	254	256	66	68	70	72
H1N11742P2	258	260	262	264	66	68	70	72
H1N11744P2	266	268	270	272	66	68	70	72
H1N11745P2	274	276	278	280	66	68	70	72
H1N11747P2	282	284	286	288	66	68	70	72
H1N11748P2	290	292	294	296	66	68	70	72



Таблица 2

Идентификационные номера последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H11723P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H11729P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H11820N	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H11829N	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H11829N2	49	51	53	55	65	67	69	71
H2aM11829N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M11830N	73	75	77	79	81	83	85	87
H1H11830N2	73	75	77	79	65	67	69	71
H1H11903N	89	91	93	95	97	99	101	103
H1H14571N	105	107	109	111	113	115	117	119
H2a14571N	105	107	109	111	113	115	117	119
H1H11704P	121	123	125	127	129	131	133	135
H1H11711P	137	139	141	143	145	147	149	151
H1H11714P	153	155	157	159	161	163	165	167
H1H11717P	169	171	173	175	177	179	181	183
H1H11724P	185	187	189	191	193	195	197	199
H1H11727P	201	203	205	207	209	211	213	215
H1H11730P	217	219	221	223	225	227	229	231
H1H11731P2	233	235	237	239	65	67	69	71
H1H11734P2	241	243	245	247	65	67	69	71
H1H11736P2	249	251	253	255	65	67	69	71
H1H11742P2	257	259	261	263	65	67	69	71
H1H11744P2	265	267	269	271	65	67	69	71
H1H11745P2	273	275	277	279	65	67	69	71
H1H11747P2	281	283	285	287	65	67	69	71
H1H11748P2	289	291	293	295	65	67	69	71

Изложенные в настоящем документе антитела обозначали, как правило, в соответствии со следующей номенклатурой: приставка Fc (например, "H1H", "H2M" и т.п.), затем числовой идентификационный номер (например, "11723", "11830" и т.п., как показано в табл. 1 или 2), затем суффикс "P", "P2", "N", "N2" или "B". Таким образом, в соответствии с данной номенклатурой антитело в настоящем документе может быть обозначено, например, как "H1H11723P", "H2M11830N" и т.п. Приставки H1H и H2M в обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывают на конкретный изотип Fc-участка антитела. Например, антитело "H1M" имеет Fc мышинового IgG1, а антитело "H2M" Fc мышинового IgG2 (изотип а или b) (все переменные участки являются полностью человеческими, на что указывает первая буква "H" в обозначении антитела). Специалисту в данной области будет понятно, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc иного изотипа (например, антитело с Fc мышинового IgG1 можно превращать в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификационными номерами, показанными в табл. 1, 2, 12 или 13, останутся такими же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или в значительной степени подобными независимо от природы Fc-домена.

#### Антитела сравнения.

С целью сравнения в некоторых из следующих примеров предусматривали контроли антитела против HA вируса гриппа. В примерах также использовали изотипически сходные отрицательные контроли. Одним антителом сравнения против HA вируса гриппа, обозначенным в настоящем документе термином "mAb контроля 1", является антитело против HA вируса гриппа с аминокислотными последовательностями тяжелой (HC) и легкой (LC) цепей, описанное в WO 2008/028946 как SEQ ID NO: 65 (HC) и SEQ ID NO: 91 (LC), а также названное CR6261. Как показано в WO 2008/028946, данное антитело CR6261 имеет аминокислотные последовательности определяющего комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR) (HCDR 1, 2 и 3), как показано в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и аминокислотные последовательности определяющего комплементарность участка легкой цепи (LCDR) (LCDR 1, 2 и 3), как показано в SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно.

Пример 3. Аффинности связывания и константы скорости реакции моноклональных антител против HA вируса гриппа с использованием биосенсора Octet.

Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для связывания гемагглютинаина вируса гриппа (HA) с отобранными очищенными моноклональными антителами против HA определяли с помощью анализа с использованием биосенсора (Octet HTX) на основе интерферометра в биослое в режиме реаль-

ного времени. Биосенсоры Octet, покрытые либо антителом против мышиноного Fc (АМС), либо антителом против человеческого Fc (АНС), использовали для захвата моноклональных антител против НА, экспрессированных с мышинным Fc (AbPID с приставкой H1M, H2aM, H2bM) или Fc человеческого IgG1 (AbPID с приставкой H1H) соответственно. Все исследования связывания выполняли в буфере для кинетического анализа HBS-ET Octet (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA) при 25°C со встряхиванием планшета со скоростью 1000 об/мин. Биосенсоры Octet, покрытые антителом, погружали в лунки, содержащие различные концентрации различных штаммов НА (300-11,11 нМ), на 7 мин с последующей диссоциацией антитела, связанного с белком НА, в буфере для кинетического анализа Octet в течение 10 мин. Между различными стадиями биосенсор каждый раз промывали в буфере для кинетического анализа Octet. Константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для обработки кривых Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и полупериоды диссоциации ( $t^{1/2}$ ) вычисляли исходя из констант скорости как

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

Кинетические параметры связывания для различных моноклональных антител против НА, связывающихся с НА различных штаммов группы 1, представлены в табл. 3. Кроме того, параметры связывания для тех же антител определяли для связывания с гемагглютинидами группы 2, однако, не наблюдали связывание с НА группы 2 (данные не показаны).

Таблица 3

Кинетические параметры связывания для моноклональных антител, связывающихся с НА различных штаммов группы 1 при 25°C

Захваченное mAb	Введенное анализируемое вещество	Количество захваченного mAb (нМ)	300 нМ связанного НА (нМ)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t^{1/2}$ (мин.)
H2aM11829N	A/California/07/2009 (H1N1)	0,53 ± 0,01	0,62	1,20E + 05	1,00E-05*	8,35E-11	1155*
	A/Puerto Rico/08/34 (H1N1)	0,53 ± 0,01	0,59	1,09E + 05	1,16E-05	1,06E-10	999
	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	0,52 ± 0,01	0,50	3,81E + 04	1,99E-05	5,23E-10	580
H1N11729P	A/California/07/2009 (H1N1)	0,65 ± 0,01	0,84	7,35E + 04	1,00E-05*	1,36E-10	1155*
	A/Puerto Rico/08/34 (H1N1)	0,67 ± 0,01	0,72	8,26E + 04	1,00E-05*	1,21E-10	1155*
	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	0,66 ± 0,01	0,62	1,99E + 04	3,10E-05	1,56E-09	373
H2aM14571N	A/California/07/2009 (H1N1)	0,51 ± 0,01	0,58	1,05E + 05	1,18E-05	1,12E-10	978
	A/Puerto Rico/08/34 (H1N1)	0,5 ± 0,02	0,46	6,80E + 04	2,44E-05	3,59E-10	474
	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	0,51 ± 0,01	0,31	1,14E + 04	1,00E-05*	8,77E-10	1155*

Пример 4. Анализ перекрестной конкуренции между антителами против НА с использованием биосенсора Octet.

Конкуренцию связывания между панелью различных моноклональных антител против НА вируса гриппа определяли с использованием безмаркерного анализа интерферометрии в биослое на биосенсоре Octet® НТХ в режиме реального времени (ForteBio, A Division of Pall Life Sciences). Весь эксперимент проводили при 25°C в 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20 и 1 мг/мл BSA (буфер HBS-ET Octet) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Чтобы оценить, способны ли антитела конкурировать за связывание с их соответствующими эпитопами на НА, выбирали анализ в формате предварительной смеси. Один штамм группы 1 белка НА (California) использовали для исследования перекрестной конкуренции между различными моноклональными антителами против НА. Для достижения этого 100 нМ реагента НА (Protein Sciences) сначала предварительно смешивали с концентрацией 1 мкМ различных моноклональных антител против НА (далее называемых mAb-2) в течение по меньшей мере 2 ч перед выполнением анализа конкуренции за свя-

зывание. Биосенсоры Octet, покрытые либо поликлональным антителом против мышинового Fc (Pall ForteBio Corp., № 18-5088; далее называемым АМС), либо поликлональным антителом против человеческого Fc (Pall ForteBio Corp., № 18-5060; далее называемым АНС), сперва погружали в лунки, содержащие 20 мкг/мл раствора отдельных моноклональных антител против НА, на 3 мин для захвата моноклональных антител против НА, экспрессированных либо с мышинным Fc, либо с человеческим Fc соответственно (далее называемым mAb-1). Затем после стадии захвата свободное поликлональное антитело против мышинового Fc и поликлональное антитело против человеческого Fc насыщали путем погружения биосенсоров Octet в лунки, содержащие 1 мкМ раствор смеси нерелевантного моноклонального антитела, экспрессированного с различными Fc (человеческого IgG1, мышинового IgG2a и мышинового IgG2b), на 3 мин. Наконец, биосенсоры Octet погружали на 5 мин в лунки, содержащие предварительно смешанные образцы 100 нМ НА и mAb-2 с концентрацией 1 мкМ. В конце каждого цикла захваченные моноклональные антитела против НА вместе со связанным предварительно образовавшимся комплексом НА и mAb-2 восстанавливали с использованием трех чередующихся 20-секундных интервалов в 20 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> с последующим погружением в буфер HBS-ET Octet. Биосенсоры промывали в буфере HBS-ET Octet между каждой стадией эксперимента. В ходе всего эксперимента реакцию связывания регистрировали в режиме реального времени и измеряли реакцию связывания в конце каждой стадии. В ходе анализа сигнал фонового самосвязывания (если mAb-1=mAb-2), вызванный неспецифическим связыванием моноклонального антитела против НА со свободной поверхностью захвата, вычитали из всей колонки и получали таблицу перекрестной конкуренции (табл. 4). Сравнивали реакцию связывания mAb-1 с предварительно образовавшимся комплексом НА и mAb-2 и определяли характер конкурентного/неконкурентного связывания разных моноклональных антител против НА.

Как показано в табл. 4, в левой колонке представлены антитела mAb1, которые захвачены с использованием биосенсоров АНС Octet, в правой колонке представлены антитела (mAb2), которые перекрестно конкурируют с антителом mAb1.

Таблица 4

Перекрестная конкуренция между панелью различных моноклональных антител против НА за связывание со штаммом НА H1N1 California

Первое mAb (mAb-1), захваченное с использованием биосенсоров АНС Octet	Антитела mAb-2, которые, как показано, конкурируют с mAb-1
H2aM11829N	H2aM14571N H1H11729P
H2aM14571N	H2aM11829N H1H11729P
H1H11729P	H2aM11829N H2aM14571N

Пример 4. Отобранные специфические по отношению к группе 1 моноклональные антитела против гемагглютинаина вируса гриппа А, демонстрирующие эффективную нейтрализацию вируса гриппа А *in vitro* в отношении различных штаммов группы 1.

Анализ микронейтрализации на основании жизнеспособности клеток.

Моноклональные антитела тестировали в анализе микронейтрализации для оценивания широты и эффективности. Вкратце, клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) высевали при  $6,0 \times 10^3$  клеток/лунка в 96-луночный планшет. В фоновые контрольные лунки добавляли только разбавитель вируса. Клетки инкубировали в течение 4-5 ч при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Моноклональные антитела разбавляли при 4-кратной конечной концентрации разбавителем вируса. Антитела разбавляли 1:3 в двух повторностях. Вирус размораживали на льду и разбавляли до подходящей предварительно определенной концентрации. Разбавленный вирус добавляли в разбавленные mAb. Смесь mAb с вирусом немедленно переносили в клетки MDCK и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. Также предусматривали лунки вирусного контроля и контроля неинфицированных клеток. В день 4 планшеты центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 мин. Клетки лизировали с использованием 100 мкл субстрата CelTiter-Glo и измеряли высвобождение АТФ с использованием люминесценции (Victor X3, PerkinElmer). Жизнеспособность в процентах определяли относительно неинфицированного контроля. Значения жизнеспособности анализировали с использованием нелинейной регрессии 4PL для определения значений IC<sub>50</sub> (GraphPad Prism).

mAb демонстрировали эффективность в отношении широкого диапазона вирусов гриппа А группы 1 (табл. 5), в том числе различных штаммов H1N1, H5N1, H9N2, H13N6 и H16N3. Значения IC<sub>50</sub> варьировали от 1,68 до 48 нМ для H2aM11829N и от 2,47 до 129,5 нМ для H1H11729P.

Таблица 5

Эффективность нейтрализации в отношении различных типичных штаммов вируса гриппа группы 1 (показано среднее 3-5 опытов)

PID	IC <sub>50</sub> (нМ)						
	H1_ PR34	H1_ WS33	H1_ IVR148	H1_ CA09	H9_ RG26	H13_ MD77	H16_ DE09
H2aM11829N	3,29	1,68	48,0	3,50	10,2	2,11	7,39
H1N11729P	2,82	2,47	129,5	4,54	14,9	33,8	21,6

Пример 5. Отобранные специфические по отношению к гемагглютинирующему вирусу гриппа А группы 1 моноклональные антитела, демонстрирующие эффективную нейтрализацию вируса гриппа А *in vitro*.

Типичные моноклональные антитела (mAb) H1N11829N2 и H1N11729P отбирали для *in vitro* анализов микронейтрализации. Вкратце, клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) высевали и инкубировали в течение ночи до достижения 80-100% конfluence на следующий день. Моноклональные антитела разбавляли средой вирусной инфекции (VIM) до 50 мкг/мл и разбавляли 1:2 в трех повторностях или в четырех повторностях. H5N1 A/Vietnam/1203/2004 или H1N1 A/California/07/2009 разбавляли в VIM, добавляли к разбавленным антителам и инкубировали в течение 1 ч. Затем образцы переносили в MDCK и инкубировали в течение 48 ч. После инкубации 50 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет. Добавляли разбавленные красные кровяные клетки индюка или лошади к супернатанту и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 или 60 мин. Регистрировали титр гемагглютинации как кратность последнего разведения, которое полностью ингибировало гемагглютинацию.

Типичные антитела H1N11829N2 и H1N11729P демонстрировали эффективную нейтрализацию H5N1 A/Vietnam/1203/2004 и H1N1 A/California/07/2009 (табл. 6). Средние значения IC<sub>90</sub> для типичных антител H1N11829N2 и H1N11729P в отношении нейтрализации H5N1 A/Vietnam/1203/2004 составляли в среднем 62,50 и 26,05 нМ (соответственно).

Таблица 6

Гемагглютининовые титры после анализа микронейтрализации H5N1 A/Vietnam/1203/2004 и H1N1 A/California/07/2009 с отобранными антителами, специфическими в отношении гемагглютинина группы 1. Представлены значения IC<sub>90</sub> (нМ)

Номер антитела	IC <sub>90</sub> (нМ)		IC <sub>90</sub> (нМ)
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 1
H1N11829N2	83,3	41,7	41,7
H1N11729P	41,7	10,4	83,3

Пример 6. Зависимая от комплемента цитотоксичность для инфицированных вирусом гриппа клеток *in vitro* с использованием специфических в отношении вируса гриппа А моноклональных антител.

Типичные моноклональные антитела (mAb) H1N11829N2 и H1N11729P отбирали для *in vitro* анализов зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC). Вкратце, клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) высевали за 24 ч до инфицирования с H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 при MOI 3. После инкубации в течение 20-25 ч клетки собирали и повторно суспендировали в среде для анализа CDC при концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Разбавленные целевые клетки (20 мкл) добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета. Моноклональные антитела разбавляли до трехкратной конечной исходной концентрации в среде для анализа CDC, а затем разбавляли 1:2 в трех повторностях или в четырех повторностях. Среду для анализа CDC добавляли в каждую лунку, не получавшую mAb. Планшет встряхивали при комнатной температуре в течение ~2 мин при ~500 об/мин. Нормальный комплемент сыворотки крови человека (NHSC) получали при трехкратной конечной концентрации (15%) в среде для анализа CDC и 20 мкл добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и в это время доводили реагент для лизиса, буфер и субстрат до комнатной температуры. Реагент для лизиса получали путем разбавления дигитонина в среде для анализа CDC и 5 мкл этого реагента добавляли в контрольные лунки максимального лизиса для установления контроля максимального сигнала. Субстрат и буфер объединяли, 20 мкл добавляли во все лунки и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Сигнал выявляли на устройстве для считывания планшетов (Victor X3, Perkin Elmer). Специфический лизис в процентах вычисляли как ((лизис посредством mAb+NHSC)-(лизис посредством только NHSC))/((максимальный лизис посредством дигитонина)-(лизис посредством только NHSC))×100. Анализ выполняли с помощью четырехпараметровой нелинейной регрессии по 8-точечной кривой ответа (GraphPad Prism). Данные наносили на график для отдельных испытаний ± стандартное отклонение, и данные представляли как средние всех испытаний ± стандартная ошибка среднего значения.

Типичные антитела H1N11829N2 и H1N11729P демонстрировали эффективный опосредованный комплементом лизис инфицированных клеток. Три произвольно выбранных испытания представлены в табл. 7. Средние значения EC<sub>50</sub> для типичных антител H1N11829N2 и H1N11729P составляли в среднем

41,88 нМ ( $\pm 13,08$  SEM), а для H1N11729P составляли 43,25 нМ ( $\pm 3,83$  SEM) соответственно.

Таблица 7

Специфический лизис в процентах инфицированных H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 целевых клеток с помощью специфических по отношению к гемагглютинуину группы 1 антител. Представлены значения  $EC_{50}$  (нМ) для каждой из трех повторностей

AbPID	EC <sub>50</sub> (нМ)		
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3
H1N11829N2	65,94	38,75	20,94
H1N11729P	50,83	38,49	40,44
Нерелевантное mAb hIgG1	> 333	> 333	> 333

Пример 7. Отобранные специфические по отношению к гемагглютинуину вируса гриппа А группы 1 моноклональные антитела, демонстрирующие эффективную нейтрализацию инфекции вируса гриппа А *in vivo*.

Мышиная профилактическая модель с однократной дозой.

Типичные моноклональные антитела H2aM11829N, H1N11729P и H2a14571N отбирали для *in vivo* исследований защиты с использованием мышей BALB/c. Вкратце, самкам мышей возрастом приблизительно 6 недель (приблизительно 17,5 $\pm$ 0,5 г) вводили инъекцией подкожно (SC) 1 мг/кг H2aM11829N, H1N11729P, H2a14571N или антитело мышиного или человеческого изотипа (отрицательный контроль) в день -1. Пять мышей включали в группу для эксперимента. Через 24 ч после инъекции (день 0) мышей сенсibilizировали интраназально (IN) с помощью 10 $\times$ MLD<sub>50</sub> (800 бляшкообразующих единиц; PFU) в 20 мкл физиологического раствора с H1N1 A/Puerto Rico/08/1934. Мышей взвешивали ежедневно и умерщвляли при потере ими >20% их изначально исходной массы.

Типичные антитела H2aM11829N, H1N11729P и H2a14571N демонстрировали эффективную нейтрализацию инфекции вируса гриппа А *in vivo* при 1 мг/кг.

Мышиная дозозависимая профилактическая модель.

Типичные моноклональные антитела H1N11829N2 и H1N11729P отбирали для *in vivo* исследований профилактической защиты с использованием мышей BALB/c. Вкратце, самкам мышей возрастом 6 недель (приблизительно 17,5 $\pm$ 0,5 г) вводили инъекцией SC 1, 0,5, 0,1 или 0,05 мг/кг или 2, 0,5, 0,2 или 0,05 мг/кг антитела H1N11829N2, H1N11729P в день -1. Пять мышей включали в группу для эксперимента. Белок-носитель (нерелевантное mAb hIgG1) добавляли во все дозы mAb при 1 мг/мл. Через 24 ч после инъекции (день 0) мышей сенсibilizировали интраназально с помощью 10 $\times$ MLD<sub>50</sub> (800 бляшкообразующих единиц; PFU) в 20 мкл физиологического раствора с H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 или 5 $\times$ MLD<sub>50</sub> (5000 PFU) в 20 мкл физиологического раствора с H1N1 A/California/04/2009. Мышей взвешивали ежедневно и умерщвляли при потере ими >20% их изначально исходной массы.

При сенсibilизации с помощью H1\_PR34 типичные антитела H1N11829N2 и H1N11729P демонстрировали эффективную нейтрализацию инфекции гриппа А *in vivo* при 1 мг/кг. При 0,5 и 0,1 мг/кг H1N11729P демонстрировало 100 и 40% выживаемость соответственно (табл. 8-10). При сенсibilизации с помощью H1\_CA09 типичные антитела H1N11829N2 и H1N11729P демонстрировали эффективную нейтрализацию инфекции гриппа А *in vivo* при 2, 0,5 и 0,2 мг/кг и демонстрировали 60% выживаемость при 0,05 мг/кг (табл. 8-10).

Таблица 8

Выживаемость мышей в процентах в эксперименте 1 после введения 1 мг/кг специфических в отношении гемагглютинуина группы 1 антител, SC профилактически за один день до инфицирования с помощью 10 $\times$ MLD<sub>50</sub> H1N1 A/Puerto Rico/08/1934

PID	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)
Солевой раствор (неинфицированные)	5	100 (5/5)
H2aM11829N	5	100 (5/5)
H1N11729P	5	100 (5/5)
H2a14571N	Нет данных	Нет данных
Контроль изотипа hIgG1	5	0 (0/5)
Контроль изотипа mIgG2a	5	0 (0/5)

Таблица 9

Выживаемость мышей в процентах в эксперименте 2 после введения 1 мг/кг специфических в отношении гемагглютинина группы 1 антител, SC профилактически за один день до инфицирования с помощью  $10 \times \text{MLD}_{50}$  H1N1 A/Puerto Rico/08/1934

PID	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)
Солевой раствор (неинфицированные)	5	100 (5/5)
H2aM11829N	5	100 (5/5)
H1N11729P	5	100 (5/5)
H2a14571N	5	100 (5/5)

Таблица 10

Выживаемость мышей в процентах после введения 1, 0,5, 0,1 или 0,05 мг/кг специфических в отношении гемагглютинина группы 1 антител, SC профилактически за один день до инфицирования с помощью  $10 \times \text{MLD}_{50}$  H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 или 2, 0,5, 0,2 или 0,05 мг/кг, SC профилактически за один день до инфицирования с помощью  $5 \times \text{MLD}_{50}$  H1N1 A/California/04/2009

PID	Сенсибилизирующий вирус: H1N1 A/Puerto Rico/08/1934			Сенсибилизирующий вирус: H1N1 A/California/04/2009		
	Доза mAb (мг/кг)	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)	Доза mAb (мг/кг)	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)
Солевой раствор с белком-носителем (неинфицированные)	не предусмотрено	5	100 (5/5)	не предусмотрено	5	100 (5/5)
H1N11829N2	1	5	100 (5/5)	2	5	100 (5/5)
	0,5		60 (3/5)	0,5		100 (5/5)
	0,1		0 (0/5)	0,2		100 (5/5)
	0,05		20 (1/5)	0,05		ND
H1N11729P	1	5	100 (5/5)	2	5	100 (5/5)
	0,5		100 (5/5)	0,5		100 (5/5)
	0,1		40 (2/5)	0,2		100 (5/5)
	0,05		0 (0/5)	0,05		60 (3/5)

Мышиная дозозависимая терапевтическая модель.

Типичные моноклональные антитела H1N11829N2 и H1N11729P отбирали для *in vivo* исследований терапевтической защиты с использованием мышей BALB/c. Вкратце, самок мышей возрастом 6 недель (приблизительно  $17,5 \pm 0,5$  г) инфицировали интраназально  $10 \times \text{MLD}_{50}$  (800 бляшкообразующих единиц; PFU) в 20 мкл физиологического раствора с H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 или  $5 \times \text{MLD}_{50}$  (5000 PFU) в 20 мкл физиологического раствора с H1N1 A/California/04/2009. Через три, четыре или пять дней (в случае H1PR34) или через один, два или три дня (в случае H1CA09) после инфекции отдельным группам из 5 мышей вводили инъекцией IV 15 или 30 мг/кг антитела H1N11829N2 или H1N11729P. Мышей взвешивали ежедневно и умерщвляли при потере ими  $>20\%$  их изначально исходной массы.

При сенсибилизации с помощью как исторического, так и современного штамма вируса H1N1 типичные антитела H1N11829N2 и H1N11729P демонстрировали эффективную нейтрализацию инфекции группа A *in vivo* (табл. 11).

Таблица 11

Выживаемость мышей в процентах в терапевтической модели инфекции. Мышей инфицировали с помощью  $10 \times \text{MLD}_{50}$  H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 или с помощью  $5 \times \text{MLD}_{50}$  H1N1 A/California/04/2009 в день 0. В дни 3, 4 или 5 (для H1N1 A/Puerto Rico/08/1934) или дни 1, 2 или 3 (для H1N1 A/California/04/2009) мышинные антитела вводили при 15 или 30 мг/кг, IV

PID	Сенсибилизирующий вирус: H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 (15 мг/кг mAb)			Сенсибилизирующий вирус: H1N1 A/California/04/2009 (30 мг/кг mAb)		
	Дни после инфекции	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)	Дни после инфекции и	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)
H1N118 29N2	3	5	40 (2/5)	1	5	100 (5/5)
	4		Нет данных	2		0 (0/5)
	5		Нет данных	3		20 (1/5)
H1N117 29P	3	5	60 (3/5)	1	5	100 (5/5)
	4		0 (0/5)	2		0 (0/5)
	5		0 (0/5)	3		20 (1/5)

Пример 8. Отобранные специфические по отношению к гемагглютинирующему вирусу гриппа А группы 1 моноклональные антитела создавали после иммунизации иммуногенами H5.

Дополнительные человеческие антитела против HA вируса гриппа А создавали у мышей VE-LOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую вариационные участки тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина человека. Не получающих ранее обработку мышей делили на четыре группы. Группы 1 и 2 иммунизировали составом трехвалентной вакцины против гриппа (TIV) Afluria® 2013-2014 (NDC 3332-110-10). Группы 3 и 4 оставляли неиммунизированными. Приблизительно через четыре недели группам 1 и 3 вводили инъекцию внутримышечно 50 мкг ДНК H5 (VRC9123, кодирующей H5 A/Indonesia/05/2005 (см. Ledgerwood et al. (2011) Lancet Infect. Dis. 11: 916-924; Khurana et al. (2013) J. Infect. Dis. 208: 413-417; Ledgerwood et al. (2013) J. Infect. Dis. 208: 418-422), а группам 2 и 4 вводили инъекцию внутримышечно 5 мкг моновалентной вакцины против гриппа H5 (MIV; VRC310, содержащей H5 A/Indonesia/05/2005) (см. Ledgerwood et al. (2011) Lancet Infect. Dis. 11: 916-924; Khurana et al. (2013) J. Infect. Dis. 208: 413-417; Ledgerwood et al. (2013) J. Infect. Dis. 208: 418-422). Приблизительно через четыре недели все 4 группы иммунизировали с помощью 5 мкг моновалентной вакцины против гриппа H5 (MIV; VRC310, содержащей H5 A/Indonesia/05/2005).

Антитела против HA вируса гриппа А выделяли непосредственно из мутированного сайта связывания с рецептором (RBS), меченных авидином H5 A/Indonesia/05/2005 и/или H1 A/New Caledonia/20/1999, которые содержали карбоксиконцевой домен тримеризации из положительных по фибритину фага T4 (фолдону) мышинных В-клеток, без слияния с клетками меланомы, как описано в патенте США № 7582298. С использованием данного способа получали некоторые дополнительные полностью человеческие антитела против HA вируса гриппа А (т.е. антитела, обладающие человеческими вариационными доменами и человеческими константными доменами); типичные антитела, созданные данным путем, можно найти в приведенных ниже табл. 12 ("Идентификационные номера аминокислотных последовательностей") и 13 ("Идентификационные номера последовательностей нуклеиновых кислот"). Образцы оценивали по связыванию с мутированным сайтом связывания с рецептором (RBS), фолдоном, меченных авидином H5 и H1 с помощью Luminex. Как и предполагали, все, кроме 16 образцов, связывались с белком H5 со средними интенсивностями флуоресценции (MFI) более 15000. Однако, по большей части, образцы, которые также связывались с белком H1, характеризовались высокой степенью связывания с H5 (т.е. более 15000 MFI). Наблюдали две группы моноклональных антител: те, которые связывались с H1 при более 15000 MFI (20 образцов), и те, которые связывались с H5 при более 5000 MFI (44 образца).

Таблица 12  
Идентификационные номера аминокислотных последовательностей

Обозначение антигена	Аминокислотная SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1N17952B	298	300	302	304	306	308	310	312
H1N17953B	314	316	318	320	322	324	326	328
H1N17954B	330	332	334	336	338	340	342	344
H1N17955B	346	348	350	352	354	356	358	360
H1N17956B	362	364	366	368	370	372	374	376
H1N17957B	378	380	382	384	386	388	390	392
H1N17958B	394	396	398	400	402	404	406	408
H1N17959B	410	412	414	416	418	420	422	424
H1N17960B	426	428	430	432	434	436	438	440
H1N17961B	442	444	446	448	450	452	454	456
H1N17962B	458	460	462	464	466	468	470	472
H1N17963B	474	476	478	480	482	484	486	488
H1N17964B	490	492	494	496	498	500	502	504
H1N17965B	506	508	510	512	514	516	518	520
H1N17966B	522	524	526	528	530	532	534	536
H1N17967B	538	540	542	544	546	548	550	552
H1N17968B	554	556	558	560	562	564	566	568
H1N17969B	570	572	574	576	578	580	582	584
H1N17970B	586	588	590	592	594	596	598	600
H1N17971B	602	604	606	608	610	612	614	616
H1N17972B	618	620	622	624	626	628	630	632
H1N17973B	634	636	638	640	642	644	646	648
H1N17974B	650	652	654	656	658	660	662	664
H1N17975B	666	668	670	672	674	676	678	680
H1N17976B	682	684	686	688	690	692	694	696
H1N17977B	698	700	702	704	706	708	710	712
H1N17978B	714	716	718	720	722	724	726	728
H1N17979B	730	732	734	736	738	740	742	744
H1N17980B	746	748	750	752	754	756	758	760
H1N17981B	762	764	766	768	770	772	774	776
H1N17982B	778	780	782	784	786	788	790	792
H1N17983B	794	796	798	800	802	804	806	808
H1N17984B	810	812	814	816	818	820	822	824
H1N17985B	826	828	830	832	834	836	838	840
H1N17986B	842	844	846	848	850	852	854	856
H1N17987B	858	860	862	864	866	868	870	872
H1N17988B	874	876	878	880	882	884	886	888
H1N17989B	890	892	894	896	898	900	902	904
H1N17990B	906	908	910	912	914	916	918	920
H1N17991B	922	924	926	928	930	932	934	936
H1N17992B	938	940	942	944	946	948	950	952
H1N17993B	954	956	958	960	962	964	966	968
H1N17994B	970	972	974	976	978	980	982	984
H1N17995B	986	988	990	992	994	996	998	1000
H1N17996B	1002	1004	1006	1008	1010	1012	1014	1016
H1N17997B	1018	1020	1022	1024	1026	1028	1030	1032
H1N17998B	1034	1036	1038	1040	1042	1044	1046	1048
H1N17999B	1050	1052	1054	1056	1058	1060	1062	1064
H1N18000B	1066	1068	1070	1072	1074	1076	1078	1080
H1N18001B	1082	1084	1086	1088	1090	1092	1094	1096
H1N18002B	1098	1100	1102	1104	1106	1108	1110	1112
H1N18003B	1114	1116	1118	1120	1122	1124	1126	1128
H1N18004B	1130	1132	1134	1136	1138	1140	1142	1144
H1N18005B	1146	1148	1150	1152	1154	1156	1158	1160
H1N18006B	1162	1164	1166	1168	1170	1172	1174	1176
H1N18007B	1178	1180	1182	1184	1186	1188	1190	1192
H1N18008B	1194	1196	1198	1200	1202	1204	1206	1208
H1N18009B	1210	1212	1214	1216	1218	1220	1222	1224
H1N18010B	1226	1228	1230	1232	1234	1236	1238	1240
H1N18011B	1242	1244	1246	1248	1250	1252	1254	1256
H1N18012B	1258	1260	1262	1264	1266	1268	1270	1272



036953

HIH18013B	1274	1276	1278	1280	1282	1284	1286	1288
HIH18014B	1290	1292	1294	1296	1298	1300	1302	1304
HIH18015B	1306	1308	1310	1312	1314	1316	1318	1320
HIH18016B	1322	1324	1326	1328	1330	1332	1334	1336
HIH18017B	1338	1340	1342	1344	1346	1348	1350	1352
HIH18018B	1354	1356	1358	1360	1362	1364	1366	1368
HIH18019B	1370	1372	1374	1376	1378	1380	1382	1384
HIH18020B	1386	1388	1390	1392	1394	1396	1398	1400
HIH18021B	1402	1404	1406	1408	1410	1412	1414	1416
HIH18022B	1418	1420	1422	1424	1426	1428	1430	1432
HIH18023B	1434	1436	1438	1440	1442	1444	1446	1448
HIH18024B	1450	1452	1454	1456	1458	1460	1462	1464
HIH18025B	1466	1468	1470	1472	1474	1476	1478	1480
HIH18026B	1482	1484	1486	1488	1490	1492	1494	1496
HIH18027B	1498	1500	1502	1504	1506	1508	1510	1512
HIH18028B	1514	1516	1518	1520	1522	1524	1526	1528
HIH18029B	1530	1532	1534	1536	1538	1540	1542	1544
HIH18030B	1546	1548	1550	1552	1554	1556	1558	1560
HIH18031B	1562	1564	1566	1568	1570	1572	1574	1576
HIH18032B	1578	1580	1582	1584	1586	1588	1590	1592
HIH18033B	1594	1596	1598	1600	1602	1604	1606	1608
HIH18034B	1610	1612	1614	1616	1618	1620	1622	1624
HIH18035B	1626	1628	1630	1632	1634	1636	1638	1640
HIH18037B	1642	1644	1646	1648	1650	1652	1654	1656
HIH18038B	1658	1660	1662	1664	1666	1668	1670	1672
HIH18039B	1674	1676	1678	1680	1682	1684	1686	1688
HIH18040B	1690	1692	1694	1696	1698	1700	1702	1704
HIH18041B	1706	1708	1710	1712	1714	1716	1718	1720
HIH18042B	1722	1724	1726	1728	1730	1732	1734	1736
HIH18043B	1738	1740	1742	1744	1746	1748	1750	1752
HIH18044B	1754	1756	1758	1760	1762	1764	1766	1768
HIH18045B	1770	1772	1774	1776	1778	1780	1782	1784
HIH18046B	1786	1788	1790	1792	1794	1796	1798	1800
HIH18047B	1802	1804	1806	1808	1810	1812	1814	1816
HIH18048B	1818	1820	1822	1824	1826	1828	1830	1832
HIH18049B	1834	1836	1838	1840	1842	1844	1846	1848
HIH18051B	1850	1852	1854	1856	1858	1860	1862	1864
HIH18052B	1866	1868	1870	1872	1874	1876	1878	1880
HIH18053B	1882	1884	1886	1888	1890	1892	1894	1896
HIH18054B	1898	1900	1902	1904	1906	1908	1910	1912
HIH18055B	1914	1916	1918	1920	1922	1924	1926	1928
HIH18056B	1930	1932	1934	1936	1938	1940	1942	1944
HIH18057B	1946	1948	1950	1952	1954	1956	1958	1960
HIH18058B	1962	1964	1966	1968	1970	1972	1974	1976
HIH18059B	1978	1980	1982	1984	1986	1988	1990	1992
HIH18060B	1994	1996	1998	2000	2002	2004	2006	2008
HIH18061B	2010	2012	2014	2016	2018	2020	2022	2024
HIH18062B	2026	2028	2030	2032	2034	2036	2038	2040
HIH18063B	2042	2044	2046	2048	2050	2052	2054	2056
HIH18064B	2058	2060	2062	2064	2066	2068	2070	2072
HIH18065B	2074	2076	2078	2080	2082	2084	2086	2088
HIH18066B	2090	2092	2094	2096	2098	2100	2102	2104
HIH18067B	2106	2108	2110	2112	2114	2116	2118	2120
HIH18068B	2122	2124	2126	2128	2130	2132	2134	2136
HIH18069B	2138	2140	2142	2144	2146	2148	2150	2152
HIH18070B	2154	2156	2158	2160	2162	2164	2166	2168
HIH18071B	2170	2172	2174	2176	2178	2180	2182	2184
HIH18072B	2186	2188	2190	2192	2194	2196	2198	2200
HIH18073B	2202	2204	2206	2208	2210	2212	2214	2216
HIH18074B	2218	2220	2222	2224	2226	2228	2230	2232
HIH18075B	2234	2236	2238	2240	2242	2244	2246	2248
HIH18076B	2250	2252	2254	2256	2258	2260	2262	2264
HIH18077B	2266	2268	2270	2272	2274	2276	2278	2280
HIH18078B	2282	2284	2286	2288	2290	2292	2294	2296
HIH18079B	2298	2300	2302	2304	2306	2308	2310	2312
HIH18080B	2314	2316	2318	2320	2322	2324	2326	2328
HIH18081B	2330	2332	2334	2336	2338	2340	2342	2344
HIH18082B	2346	2348	2350	2352	2354	2356	2358	2360
HIH18083B	2362	2364	2366	2368	2370	2372	2374	2376
HIH18084B	2378	2380	2382	2384	2386	2388	2390	2392

## 036953

HIH18085B	2394	2396	2398	2400	2402	2404	2406	2408
HIH18086B	2410	2412	2414	2416	2418	2420	2422	2424
HIH18087B	2426	2428	2430	2432	2434	2436	2438	2440
HIH18088B	2442	2444	2446	2448	2450	2452	2454	2456
HIH18089B	2458	2460	2462	2464	2466	2468	2470	2472
HIH18090B	2474	2476	2478	2480	2482	2484	2486	2488
HIH18091B	2490	2492	2494	2496	2498	2500	2502	2504
HIH18092B	2506	2508	2510	2512	2514	2516	2518	2520
HIH18093B	2522	2524	2526	2528	2530	2532	2534	2536
HIH18094B	2538	2540	2542	2544	2546	2548	2550	2552
HIH18095B	2554	2556	2558	2560	2562	2564	2566	2568
HIH18096B	2570	2572	2574	2576	2578	2580	2582	2584
HIH18097B	2586	2588	2590	2592	2594	2596	2598	2600
HIH18098B	2602	2604	2606	2608	2610	2612	2614	2616
HIH18099B	2618	2620	2622	2624	2626	2628	2630	2632
HIH18100B	2634	2636	2638	2640	2642	2644	2646	2648
HIH18101B	2650	2652	2654	2656	2658	2660	2662	2664
HIH18102B	2666	2668	2670	2672	2674	2676	2678	2680
HIH18103B	2682	2684	2686	2688	2690	2692	2694	2696
HIH18104B	2698	2700	2702	2704	2706	2708	2710	2712
HIH18105B	2714	2716	2718	2720	2722	2724	2726	2728
HIH18107B	2730	2732	2734	2736	2738	2740	2742	2744
HIH18108B	2746	2748	2750	2752	2754	2756	2758	2760
HIH18109B	2762	2764	2766	2768	2770	2772	2774	2776
HIH18110B	2778	2780	2782	2784	2786	2788	2790	2792
HIH18111B	2794	2796	2798	2800	2802	2804	2806	2808
HIH18112B	2810	2812	2814	2816	2818	2820	2822	2824
HIH18113B	2826	2828	2830	2832	2834	2836	2838	2840
HIH18114B	2842	2844	2846	2848	2850	2852	2854	2856
HIH18115B	2858	2860	2862	2864	2866	2868	2870	2872
HIH18116B	2874	2876	2878	2880	2882	2884	2886	2888
HIH18117B	2890	2892	2894	2896	2898	2900	2902	2904
HIH18118B	2906	2908	2910	2912	2914	2916	2918	2920
HIH18119B	2922	2924	2926	2928	2930	2932	2934	2936
HIH18120B	2938	2940	2942	2944	2946	2948	2950	2952
HIH18121B	2954	2956	2958	2960	2962	2964	2966	2968
HIH18122B	2970	2972	2974	2976	2978	2980	2982	2984
HIH18123B	2986	2988	2990	2992	2994	2996	2998	3000
HIH18124B	3002	3004	3006	3008	3010	3012	3014	3016
HIH18125B	3018	3020	3022	3024	3026	3028	3030	3032
HIH18126B	3034	3036	3038	3040	3042	3044	3046	3048
HIH18127B	3050	3052	3054	3056	3058	3060	3062	3064
HIH18128B	3066	3068	3070	3072	3074	3076	3078	3080
HIH18129B	3082	3084	3086	3088	3090	3092	3094	3096
HIH18130B	3098	3100	3102	3104	3106	3108	3110	3112
HIH18131B	3114	3116	3118	3120	3122	3124	3126	3128
HIH18132B	3130	3132	3134	3136	3138	3140	3142	3144
HIH18133B	3146	3148	3150	3152	3154	3156	3158	3160
HIH18134B	3162	3164	3166	3168	3170	3172	3174	3176
HIH18135B	3178	3180	3182	3184	3186	3188	3190	3192
HIH18136B	3194	3196	3198	3200	3202	3204	3206	3208
HIH18137B	3210	3212	3214	3216	3218	3220	3222	3224
HIH18138B	3226	3228	3230	3232	3234	3236	3238	3240
HIH18139B	3242	3244	3246	3248	3250	3252	3254	3256
HIH18140B	3258	3260	3262	3264	3266	3268	3270	3272
HIH18141B	3274	3276	3278	3280	3282	3284	3286	3288
HIH18142B	3290	3292	3294	3296	3298	3300	3302	3304
HIH18143B	3306	3308	3310	3312	3314	3316	3318	3320
HIH18144B	3322	3324	3326	3328	3330	3332	3334	3336
HIH18145B	3338	3340	3342	3344	3346	3348	3350	3352
HIH18146B	3354	3356	3358	3360	3362	3364	3366	3368
HIH18147B	3370	3372	3374	3376	3378	3380	3382	3384
HIH18148B	3386	3388	3390	3392	3394	3396	3398	3400
HIH18149B	3402	3404	3406	3408	3410	3412	3414	3416
HIH18150B	3418	3420	3422	3424	3426	3428	3430	3432
HIH18151B	3434	3436	3438	3440	3442	3444	3446	3448
HIH18152B	3450	3452	3454	3456	3458	3460	3462	3464
HIH18153B	3466	3468	3470	3472	3474	3476	3478	3480
HIH18154B	3482	3484	3486	3488	3490	3492	3494	3496
HIH18155B	3498	3500	3502	3504	3506	3508	3510	3512

## 036953

HIH18156B	3514	3516	3518	3520	3522	3524	3526	3528
HIH18157B	3530	3532	3534	3536	3538	3540	3542	3544
HIH18158B	3546	3548	3550	3552	3554	3556	3558	3560
HIH18159B	3562	3564	3566	3568	3570	3572	3574	3576
HIH18160B	3578	3580	3582	3584	3586	3588	3590	3592
HIH18161B	3594	3596	3598	3600	3602	3604	3606	3608
HIH18162B	3610	3612	3614	3616	3618	3620	3622	3624
HIH18163B	3626	3628	3630	3632	3634	3636	3638	3640
HIH18164B	3642	3644	3646	3648	3650	3652	3654	3656
HIH18165B	3658	3660	3662	3664	3666	3668	3670	3672
HIH18166B	3674	3676	3678	3680	3682	3684	3686	3688
HIH18167B	3690	3692	3694	3696	3698	3700	3702	3704
HIH18168B	3706	3708	3710	3712	3714	3716	3718	3720
HIH18169B	3722	3724	3726	3728	3730	3732	3734	3736
HIH18170B	3738	3740	3742	3744	3746	3748	3750	3752
HIH18171B	3754	3756	3758	3760	3762	3764	3766	3768
HIH18172B	3770	3772	3774	3776	3778	3780	3782	3784
HIH18173B	3786	3788	3790	3792	3794	3796	3798	3800
HIH18174B	3802	3804	3806	3808	3810	3812	3814	3816
HIH18175B	3818	3820	3822	3824	3826	3828	3830	3832
HIH18176B	3834	3836	3838	3840	3842	3844	3846	3848
HIH18177B	3850	3852	3854	3856	3858	3860	3862	3864
HIH18178B	3866	3868	3870	3872	3874	3876	3878	3880
HIH18179B	3882	3884	3886	3888	3890	3892	3894	3896
HIH18180B	3898	3900	3902	3904	3906	3908	3910	3912
HIH18181B	3914	3916	3918	3920	3922	3924	3926	3928
HIH18182B	3930	3932	3934	3936	3938	3940	3942	3944
HIH18183B	3946	3948	3950	3952	3954	3956	3958	3960
HIH18184B	3962	3964	3966	3968	3970	3972	3974	3976
HIH18185B	3978	3980	3982	3984	3986	3988	3990	3992
HIH18186B	3994	3996	3998	4000	4002	4004	4006	4008
HIH18187B	4010	4012	4014	4016	4018	4020	4022	4024
HIH18188B	4026	4028	4030	4032	4034	4036	4038	4040
HIH18189B	4042	4044	4046	4048	4050	4052	4054	4056
HIH18190B	4058	4060	4062	4064	4066	4068	4070	4072
HIH18191B	4074	4076	4078	4080	4082	4084	4086	4088
HIH18192B	4090	4092	4094	4096	4098	4100	4102	4104
HIH18193B	4106	4108	4110	4112	4114	4116	4118	4120
HIH18194B	4122	4124	4126	4128	4130	4132	4134	4136
HIH18195B	4138	4140	4142	4144	4146	4148	4150	4152
HIH18196B	4154	4156	4158	4160	4162	4164	4166	4168
HIH18197B	4170	4172	4174	4176	4178	4180	4182	4184
HIH18198B	4186	4188	4190	4192	4194	4196	4198	4200
HIH18199B	4202	4204	4206	4208	4210	4212	4214	4216
HIH18200B	4218	4220	4222	4224	4226	4228	4230	4232
HIH18201B	4234	4236	4238	4240	4242	4244	4246	4248
HIH18202B	4250	4252	4254	4256	4258	4260	4262	4264
HIH18203B	4266	4268	4270	4272	4274	4276	4278	4280
HIH18204B	4282	4284	4286	4288	4290	4292	4294	4296
HIH18205B	4298	4300	4302	4304	4306	4308	4310	4312
HIH18206B	4314	4316	4318	4320	4322	4324	4326	4328
HIH18207B	4330	4332	4334	4336	4338	4340	4342	4344
HIH18208B	4346	4348	4350	4352	4354	4356	4358	4360
HIH18209B	4362	4364	4366	4368	4370	4372	4374	4376
HIH18210B	4378	4380	4382	4384	4386	4388	4390	4392
HIH18211B	4394	4396	4398	4400	4402	4404	4406	4408
HIH18212B	4410	4412	4414	4416	4418	4420	4422	4424
HIH18213B	4426	4428	4430	4432	4434	4436	4438	4440
HIH18214B	4442	4444	4446	4448	4450	4452	4454	4456
HIH18216B	4458	4460	4462	4464	4466	4468	4470	4472
HIH18217B	4474	4476	4478	4480	4482	4484	4486	4488
HIH18218B	4490	4492	4494	4496	4498	4500	4502	4504
HIH18219B	4506	4508	4510	4512	4514	4516	4518	4520
HIH18220B	4522	4524	4526	4528	4530	4532	4534	4536
HIH18221B	4538	4540	4542	4544	4546	4548	4550	4552
HIH18222B	4554	4556	4558	4560	4562	4564	4566	4568
HIH18223B	4570	4572	4574	4576	4578	4580	4582	4584
HIH18224B	4586	4588	4590	4592	4594	4596	4598	4600
HIH18225B	4602	4604	4606	4608	4610	4612	4614	4616
HIH18226B	4618	4620	4622	4624	4626	4628	4630	4632

## 036953

HIH18227B	4634	4636	4638	4640	4642	4644	4646	4648
HIH18228B	4650	4652	4654	4656	4658	4660	4662	4664
HIH18229B	4666	4668	4670	4672	4674	4676	4678	4680
HIH18230B	4682	4684	4686	4688	4690	4692	4694	4696
HIH18231B	4698	4700	4702	4704	4706	4708	4710	4712
HIH18232B	4714	4716	4718	4720	4722	4724	4726	4728
HIH18233B	4730	4732	4734	4736	4738	4740	4742	4744
HIH18234B	4746	4748	4750	4752	4754	4756	4758	4760
HIH18235B	4762	4764	4766	4768	4770	4772	4774	4776
HIH18236B	4778	4780	4782	4784	4786	4788	4790	4792
HIH18237B	4794	4796	4798	4800	4802	4804	4806	4808
HIH18238B	4810	4812	4814	4816	4818	4820	4822	4824
HIH18239B	4826	4828	4830	4832	4834	4836	4838	4840
HIH18240B	4842	4844	4846	4848	4850	4852	4854	4856
HIH18241B	4858	4860	4862	4864	4866	4868	4870	4872
HIH18242B	4874	4876	4878	4880	4882	4884	4886	4888
HIH18243B	4890	4892	4894	4896	4898	4900	4902	4904
HIH18244B	4906	4908	4910	4912	4914	4916	4918	4920
HIH18245B	4922	4924	4926	4928	4930	4932	4934	4936
HIH18246B	4938	4940	4942	4944	4946	4948	4950	4952
HIH18247B	4954	4956	4958	4960	4962	4964	4966	4968
HIH18248B	4970	4972	4974	4976	4978	4980	4982	4984
HIH18249B	4986	4988	4990	4992	4994	4996	4998	5000
HIH18250B	5002	5004	5006	5008	5010	5012	5014	5016
HIH18251B	5018	5020	5022	5024	5026	5028	5030	5032
HIH18252B	5034	5036	5038	5040	5042	5044	5046	5048
HIH18253B	5050	5052	5054	5056	5058	5060	5062	5064
HIH18254B	5066	5068	5070	5072	5074	5076	5078	5080
HIH18255B	5082	5084	5086	5088	5090	5092	5094	5096
HIH18256B	5098	5100	5102	5104	5106	5108	5110	5112
HIH18257B	5114	5116	5118	5120	5122	5124	5126	5128
HIH18258B	5130	5132	5134	5136	5138	5140	5142	5144
HIH18259B	5146	5148	5150	5152	5154	5156	5158	5160
HIH18261B	5162	5164	5166	5168	5170	5172	5174	5176
HIH18262B	5178	5180	5182	5184	5186	5188	5190	5192
HIH18263B	5194	5196	5198	5200	5202	5204	5206	5208
HIH18264B	5210	5212	5214	5216	5218	5220	5222	5224
HIH18265B	5226	5228	5230	5232	5234	5236	5238	5240
HIH18266B	5242	5244	5246	5248	5250	5252	5254	5256
HIH18267B	5258	5260	5262	5264	5266	5268	5270	5272
HIH18268B	5274	5276	5278	5280	5282	5284	5286	5288
HIH18269B	5290	5292	5294	5296	5298	5300	5302	5304
HIH18270B	5306	5308	5310	5312	5314	5316	5318	5320
HIH18271B	5322	5324	5326	5328	5330	5332	5334	5336
HIH18272B	5338	5340	5342	5344	5346	5348	5350	5352
HIH18274B	5354	5356	5358	5360	5362	5364	5366	5368
HIH18275B	5370	5372	5374	5376	5378	5380	5382	5384
HIH18276B	5386	5388	5390	5392	5394	5396	5398	5400
HIH18277B	5402	5404	5406	5408	5410	5412	5414	5416
HIH18278B	5418	5420	5422	5424	5426	5428	5430	5432
HIH18279B	5434	5436	5438	5440	5442	5444	5446	5448
HIH18280B	5450	5452	5454	5456	5458	5460	5462	5464
HIH18281B	5466	5468	5470	5472	5474	5476	5478	5480
HIH18282B	5482	5484	5486	5488	5490	5492	5494	5496
HIH18283B	5498	5500	5502	5504	5506	5508	5510	5512
HIH18284B	5514	5516	5518	5520	5522	5524	5526	5528
HIH18285B	5530	5532	5534	5536	5538	5540	5542	5544
HIH18286B	5546	5548	5550	5552	5554	5556	5558	5560
HIH18287B	5562	5564	5566	5568	5570	5572	5574	5576
HIH18288B	5578	5580	5582	5584	5586	5588	5590	5592
HIH18289B	5594	5596	5598	5600	5602	5604	5606	5608
HIH18290B	5610	5612	5614	5616	5618	5620	5622	5624
HIH18291B	5626	5628	5630	5632	5634	5636	5638	5640
HIH18292B	5642	5644	5646	5648	5650	5652	5654	5656
HIH18293B	5658	5660	5662	5664	5666	5668	5670	5672
HIH18294B	5674	5676	5678	5680	5682	5684	5686	5688
HIH18295B	5690	5692	5694	5696	5698	5700	5702	5704
HIH18297B	5706	5708	5710	5712	5714	5716	5718	5720
HIH18298B	5722	5724	5726	5728	5730	5732	5734	5736
HIH18299B	5738	5740	5742	5744	5746	5748	5750	5752

ННН18300B	5754	5756	5758	5760	5762	5764	5766	5768
ННН18301B	5770	5772	5774	5776	5778	5780	5782	5784
ННН18302B	5786	5788	5790	5792	5794	5796	5798	5800
ННН18303B	5802	5804	5806	5808	5810	5812	5814	5816
ННН18304B	5818	5820	5822	5824	5826	5828	5830	5832
ННН18305B	5834	5836	5838	5840	5842	5844	5846	5848
ННН18306B	5850	5852	5854	5856	5858	5860	5862	5864
ННН18307B	5866	5868	5870	5872	5874	5876	5878	5880
ННН18308B	5882	5884	5886	5888	5890	5892	5894	5896
ННН18309B	5898	5900	5902	5904	5906	5908	5910	5912
ННН18310B	5914	5916	5918	5920	5922	5924	5926	5928
ННН18311B	5930	5932	5934	5936	5938	5940	5942	5944
ННН18312B	5946	5948	5950	5952	5954	5956	5958	5960
ННН18313B	5962	5964	5966	5968	5970	5972	5974	5976
ННН18314B	5978	5980	5982	5984	5986	5988	5990	5992
ННН18315B	5994	5996	5998	6000	6002	6004	6006	6008
ННН18316B	6010	6012	6014	6016	6018	6020	6022	6024
ННН18317B	6026	6028	6030	6032	6034	6036	6038	6040
ННН18318B	6042	6044	6046	6048	6050	6052	6054	6056
ННН18319B	6058	6060	6062	6064	6066	6068	6070	6072
ННН18320B	6074	6076	6078	6080	6082	6084	6086	6088
ННН18321B	6090	6092	6094	6096	6098	6100	6102	6104
ННН18322B	6106	6108	6110	6112	6114	6116	6118	6120
ННН18323B	6122	6124	6126	6128	6130	6132	6134	6136
ННН18324B	6138	6140	6142	6144	6146	6148	6150	6152
ННН18325B	6154	6156	6158	6160	6162	6164	6166	6168
ННН18326B	6170	6172	6174	6176	6178	6180	6182	6184
ННН18327B	6186	6188	6190	6192	6194	6196	6198	6200
ННН18328B	6202	6204	6206	6208	6210	6212	6214	6216
ННН18329B	6218	6220	6222	6224	6226	6228	6230	6232
ННН18330B	6234	6236	6238	6240	6242	6244	6246	6248
ННН18331B	6250	6252	6254	6256	6258	6260	6262	6264
ННН18332B	6266	6268	6270	6272	6274	6276	6278	6280
ННН18333B	6282	6284	6286	6288	6290	6292	6294	6296
ННН18334B	6298	6300	6302	6304	6306	6308	6310	6312
ННН18335B	6314	6316	6318	6320	6322	6324	6326	6328

Таблица 13

Идентификационные номера последовательностей нуклеиновых кислот

Нуклеиновая кислота SEQ ID NO:								
Обозначение антгена	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
ННН17952B	297	299	301	303	305	307	309	311
ННН17953B	313	315	317	319	321	323	325	327
ННН17954B	329	331	333	335	337	339	341	343
ННН17955B	345	347	349	351	353	355	357	359
ННН17956B	361	363	365	367	369	371	373	375
ННН17957B	377	379	381	383	385	387	389	391
ННН17958B	393	395	397	399	401	403	405	407
ННН17959B	409	411	413	415	417	419	421	423
ННН17960B	425	427	429	431	433	435	437	439
ННН17961B	441	443	445	447	449	451	453	455
ННН17962B	457	459	461	463	465	467	469	471
ННН17963B	473	475	477	479	481	483	485	487
ННН17964B	489	491	493	495	497	499	501	503
ННН17965B	505	507	509	511	513	515	517	519
ННН17966B	521	523	525	527	529	531	533	535
ННН17967B	537	539	541	543	545	547	549	551
ННН17968B	553	555	557	559	561	563	565	567
ННН17969B	569	571	573	575	577	579	581	583
ННН17970B	585	587	589	591	593	595	597	599
ННН17971B	601	603	605	607	609	611	613	615
ННН17972B	617	619	621	623	625	627	629	631
ННН17973B	633	635	637	639	641	643	645	647
ННН17974B	649	651	653	655	657	659	661	663
ННН17975B	665	667	669	671	673	675	677	679
ННН17976B	681	683	685	687	689	691	693	695
ННН17977B	697	699	701	703	705	707	709	711
ННН17978B	713	715	717	719	721	723	725	727
ННН17979B	729	731	733	735	737	739	741	743

036953

HIH17980B	745	747	749	751	753	755	757	759
HIH17981B	761	763	765	767	769	771	773	775
HIH17982B	777	779	781	783	785	787	789	791
HIH17983B	793	795	797	799	801	803	805	807
HIH17984B	809	811	813	815	817	819	821	823
HIH17985B	825	827	829	831	833	835	837	839
HIH17986B	841	843	845	847	849	851	853	855
HIH17987B	857	859	861	863	865	867	869	871
HIH17988B	873	875	877	879	881	883	885	887
HIH17989B	889	891	893	895	897	899	901	903
HIH17990B	905	907	909	911	913	915	917	919
HIH17991B	921	923	925	927	929	931	933	935
HIH17992B	937	939	941	943	945	947	949	951
HIH17993B	953	955	957	959	961	963	965	967
HIH17994B	969	971	973	975	977	979	981	983
HIH17995B	985	987	989	991	993	995	997	999
HIH17996B	1001	1003	1005	1007	1009	1011	1013	1015
HIH17997B	1017	1019	1021	1023	1025	1027	1029	1031
HIH17998B	1033	1035	1037	1039	1041	1043	1045	1047
HIH17999B	1049	1051	1053	1055	1057	1059	1061	1063
HIH18000B	1065	1067	1069	1071	1073	1075	1077	1079
HIH18001B	1081	1083	1085	1087	1089	1091	1093	1095
HIH18002B	1097	1099	1101	1103	1105	1107	1109	1111
HIH18003B	1113	1115	1117	1119	1121	1123	1125	1127
HIH18004B	1129	1131	1133	1135	1137	1139	1141	1143
HIH18005B	1145	1147	1149	1151	1153	1155	1157	1159
HIH18006B	1161	1163	1165	1167	1169	1171	1173	1175
HIH18007B	1177	1179	1181	1183	1185	1187	1189	1191
HIH18008B	1193	1195	1197	1199	1201	1203	1205	1207
HIH18009B	1209	1211	1213	1215	1217	1219	1221	1223
HIH18010B	1225	1227	1229	1231	1233	1235	1237	1239
HIH18011B	1241	1243	1245	1247	1249	1251	1253	1255
HIH18012B	1257	1259	1261	1263	1265	1267	1269	1271
HIH18013B	1273	1275	1277	1279	1281	1283	1285	1287
HIH18014B	1289	1291	1293	1295	1297	1299	1301	1303
HIH18015B	1305	1307	1309	1311	1313	1315	1317	1319
HIH18016B	1321	1323	1325	1327	1329	1331	1333	1335
HIH18017B	1337	1339	1341	1343	1345	1347	1349	1351
HIH18018B	1353	1355	1357	1359	1361	1363	1365	1367
HIH18019B	1369	1371	1373	1375	1377	1379	1381	1383
HIH18020B	1385	1387	1389	1391	1393	1395	1397	1399
HIH18021B	1401	1403	1405	1407	1409	1411	1413	1415
HIH18022B	1417	1419	1421	1423	1425	1427	1429	1431
HIH18023B	1433	1435	1437	1439	1441	1443	1445	1447
HIH18024B	1449	1451	1453	1455	1457	1459	1461	1463
HIH18025B	1465	1467	1469	1471	1473	1475	1477	1479
HIH18026B	1481	1483	1485	1487	1489	1491	1493	1495
HIH18027B	1497	1499	1501	1503	1505	1507	1509	1511
HIH18028B	1513	1515	1517	1519	1521	1523	1525	1527
HIH18029B	1529	1531	1533	1535	1537	1539	1541	1543
HIH18030B	1545	1547	1549	1551	1553	1555	1557	1559
HIH18031B	1561	1563	1565	1567	1569	1571	1573	1575
HIH18032B	1577	1579	1581	1583	1585	1587	1589	1591
HIH18033B	1593	1595	1597	1599	1601	1603	1605	1607
HIH18034B	1609	1611	1613	1615	1617	1619	1621	1623
HIH18035B	1625	1627	1629	1631	1633	1635	1637	1639
HIH18037B	1641	1643	1645	1647	1649	1651	1653	1655
HIH18038B	1657	1659	1661	1663	1665	1667	1669	1671
HIH18039B	1673	1675	1677	1679	1681	1683	1685	1687
HIH18040B	1689	1691	1693	1695	1697	1699	1701	1703
HIH18041B	1705	1707	1709	1711	1713	1715	1717	1719
HIH18042B	1721	1723	1725	1727	1729	1731	1733	1735
HIH18043B	1737	1739	1741	1743	1745	1747	1749	1751
HIH18044B	1753	1755	1757	1759	1761	1763	1765	1767
HIH18045B	1769	1771	1773	1775	1777	1779	1781	1783
HIH18046B	1785	1787	1789	1791	1793	1795	1797	1799
HIH18047B	1801	1803	1805	1807	1809	1811	1813	1815
HIH18048B	1817	1819	1821	1823	1825	1827	1829	1831
HIH18049B	1833	1835	1837	1839	1841	1843	1845	1847
HIH18051B	1849	1851	1853	1855	1857	1859	1861	1863

## 036953

HIH18052B	1865	1867	1869	1871	1873	1875	1877	1879
HIH18053B	1881	1883	1885	1887	1889	1891	1893	1895
HIH18054B	1897	1899	1901	1903	1905	1907	1909	1911
HIH18055B	1913	1915	1917	1919	1921	1923	1925	1927
HIH18056B	1929	1931	1933	1935	1937	1939	1941	1943
HIH18057B	1945	1947	1949	1951	1953	1955	1957	1959
HIH18058B	1961	1963	1965	1967	1969	1971	1973	1975
HIH18059B	1977	1979	1981	1983	1985	1987	1989	1991
HIH18060B	1993	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2007
HIH18061B	2009	2011	2013	2015	2017	2019	2021	2023
HIH18062B	2025	2027	2029	2031	2033	2035	2037	2039
HIH18063B	2041	2043	2045	2047	2049	2051	2053	2055
HIH18064B	2057	2059	2061	2063	2065	2067	2069	2071
HIH18065B	2073	2075	2077	2079	2081	2083	2085	2087
HIH18066B	2089	2091	2093	2095	2097	2099	2101	2103
HIH18067B	2105	2107	2109	2111	2113	2115	2117	2119
HIH18068B	2121	2123	2125	2127	2129	2131	2133	2135
HIH18069B	2137	2139	2141	2143	2145	2147	2149	2151
HIH18070B	2153	2155	2157	2159	2161	2163	2165	2167
HIH18071B	2169	2171	2173	2175	2177	2179	2181	2183
HIH18072B	2185	2187	2189	2191	2193	2195	2197	2199
HIH18073B	2201	2203	2205	2207	2209	2211	2213	2215
HIH18074B	2217	2219	2221	2223	2225	2227	2229	2231
HIH18075B	2233	2235	2237	2239	2241	2243	2245	2247
HIH18076B	2249	2251	2253	2255	2257	2259	2261	2263
HIH18077B	2265	2267	2269	2271	2273	2275	2277	2279
HIH18078B	2281	2283	2285	2287	2289	2291	2293	2295
HIH18079B	2297	2299	2301	2303	2305	2307	2309	2311
HIH18080B	2313	2315	2317	2319	2321	2323	2325	2327
HIH18081B	2329	2331	2333	2335	2337	2339	2341	2343
HIH18082B	2345	2347	2349	2351	2353	2355	2357	2359
HIH18083B	2361	2363	2365	2367	2369	2371	2373	2375
HIH18084B	2377	2379	2381	2383	2385	2387	2389	2391
HIH18085B	2393	2395	2397	2399	2401	2403	2405	2407
HIH18086B	2409	2411	2413	2415	2417	2419	2421	2423
HIH18087B	2425	2427	2429	2431	2433	2435	2437	2439
HIH18088B	2441	2443	2445	2447	2449	2451	2453	2455
HIH18089B	2457	2459	2461	2463	2465	2467	2469	2471
HIH18090B	2473	2475	2477	2479	2481	2483	2485	2487
HIH18091B	2489	2491	2493	2495	2497	2499	2501	2503
HIH18092B	2505	2507	2509	2511	2513	2515	2517	2519
HIH18093B	2521	2523	2525	2527	2529	2531	2533	2535
HIH18094B	2537	2539	2541	2543	2545	2547	2549	2551
HIH18095B	2553	2555	2557	2559	2561	2563	2565	2567
HIH18096B	2569	2571	2573	2575	2577	2579	2581	2583
HIH18097B	2585	2587	2589	2591	2593	2595	2597	2599
HIH18098B	2601	2603	2605	2607	2609	2611	2613	2615
HIH18099B	2617	2619	2621	2623	2625	2627	2629	2631
HIH18100B	2633	2635	2637	2639	2641	2643	2645	2647
HIH18101B	2649	2651	2653	2655	2657	2659	2661	2663
HIH18102B	2665	2667	2669	2671	2673	2675	2677	2679
HIH18103B	2681	2683	2685	2687	2689	2691	2693	2695
HIH18104B	2697	2699	2701	2703	2705	2707	2709	2711
HIH18105B	2713	2715	2717	2719	2721	2723	2725	2727
HIH18107B	2729	2731	2733	2735	2737	2739	2741	2743
HIH18108B	2745	2747	2749	2751	2753	2755	2757	2759
HIH18109B	2761	2763	2765	2767	2769	2771	2773	2775
HIH18110B	2777	2779	2781	2783	2785	2787	2789	2791
HIH18111B	2793	2795	2797	2799	2801	2803	2805	2807
HIH18112B	2809	2811	2813	2815	2817	2819	2821	2823
HIH18113B	2825	2827	2829	2831	2833	2835	2837	2839
HIH18114B	2841	2843	2845	2847	2849	2851	2853	2855
HIH18115B	2857	2859	2861	2863	2865	2867	2869	2871
HIH18116B	2873	2875	2877	2879	2881	2883	2885	2887
HIH18117B	2889	2891	2893	2895	2897	2899	2901	2903
HIH18118B	2905	2907	2909	2911	2913	2915	2917	2919
HIH18119B	2921	2923	2925	2927	2929	2931	2933	2935
HIH18120B	2937	2939	2941	2943	2945	2947	2949	2951
HIH18121B	2953	2955	2957	2959	2961	2963	2965	2967
HIH18122B	2969	2971	2973	2975	2977	2979	2981	2983

## 036953

HIH18123B	2985	2987	2989	2991	2993	2995	2997	2999
HIH18124B	3001	3003	3005	3007	3009	3011	3013	3015
HIH18125B	3017	3019	3021	3023	3025	3027	3029	3031
HIH18126B	3033	3035	3037	3039	3041	3043	3045	3047
HIH18127B	3049	3051	3053	3055	3057	3059	3061	3063
HIH18128B	3065	3067	3069	3071	3073	3075	3077	3079
HIH18129B	3081	3083	3085	3087	3089	3091	3093	3095
HIH18130B	3097	3099	3101	3103	3105	3107	3109	3111
HIH18131B	3113	3115	3117	3119	3121	3123	3125	3127
HIH18132B	3129	3131	3133	3135	3137	3139	3141	3143
HIH18133B	3145	3147	3149	3151	3153	3155	3157	3159
HIH18134B	3161	3163	3165	3167	3169	3171	3173	3175
HIH18135B	3177	3179	3181	3183	3185	3187	3189	3191
HIH18136B	3193	3195	3197	3199	3201	3203	3205	3207
HIH18137B	3209	3211	3213	3215	3217	3219	3221	3223
HIH18138B	3225	3227	3229	3231	3233	3235	3237	3239
HIH18139B	3241	3243	3245	3247	3249	3251	3253	3255
HIH18140B	3257	3259	3261	3263	3265	3267	3269	3271
HIH18141B	3273	3275	3277	3279	3281	3283	3285	3287
HIH18142B	3289	3291	3293	3295	3297	3299	3301	3303
HIH18143B	3305	3307	3309	3311	3313	3315	3317	3319
HIH18144B	3321	3323	3325	3327	3329	3331	3333	3335
HIH18145B	3337	3339	3341	3343	3345	3347	3349	3351
HIH18146B	3353	3355	3357	3359	3361	3363	3365	3367
HIH18147B	3369	3371	3373	3375	3377	3379	3381	3383
HIH18148B	3385	3387	3389	3391	3393	3395	3397	3399
HIH18149B	3401	3403	3405	3407	3409	3411	3413	3415
HIH18150B	3417	3419	3421	3423	3425	3427	3429	3431
HIH18151B	3433	3435	3437	3439	3441	3443	3445	3447
HIH18152B	3449	3451	3453	3455	3457	3459	3461	3463
HIH18153B	3465	3467	3469	3471	3473	3475	3477	3479
HIH18154B	3481	3483	3485	3487	3489	3491	3493	3495
HIH18155B	3497	3499	3501	3503	3505	3507	3509	3511
HIH18156B	3513	3515	3517	3519	3521	3523	3525	3527
HIH18157B	3529	3531	3533	3535	3537	3539	3541	3543
HIH18158B	3545	3547	3549	3551	3553	3555	3557	3559
HIH18159B	3561	3563	3565	3567	3569	3571	3573	3575
HIH18160B	3577	3579	3581	3583	3585	3587	3589	3591
HIH18161B	3593	3595	3597	3599	3601	3603	3605	3607
HIH18162B	3609	3611	3613	3615	3617	3619	3621	3623
HIH18163B	3625	3627	3629	3631	3633	3635	3637	3639
HIH18164B	3641	3643	3645	3647	3649	3651	3653	3655
HIH18165B	3657	3659	3661	3663	3665	3667	3669	3671
HIH18166B	3673	3675	3677	3679	3681	3683	3685	3687
HIH18167B	3689	3691	3693	3695	3697	3699	3701	3703
HIH18168B	3705	3707	3709	3711	3713	3715	3717	3719
HIH18169B	3721	3723	3725	3727	3729	3731	3733	3735
HIH18170B	3737	3739	3741	3743	3745	3747	3749	3751
HIH18171B	3753	3755	3757	3759	3761	3763	3765	3767
HIH18172B	3769	3771	3773	3775	3777	3779	3781	3783
HIH18173B	3785	3787	3789	3791	3793	3795	3797	3799
HIH18174B	3801	3803	3805	3807	3809	3811	3813	3815
HIH18175B	3817	3819	3821	3823	3825	3827	3829	3831
HIH18176B	3833	3835	3837	3839	3841	3843	3845	3847
HIH18177B	3849	3851	3853	3855	3857	3859	3861	3863
HIH18178B	3865	3867	3869	3871	3873	3875	3877	3879
HIH18179B	3881	3883	3885	3887	3889	3891	3893	3895
HIH18180B	3897	3899	3901	3903	3905	3907	3909	3911
HIH18181B	3913	3915	3917	3919	3921	3923	3925	3927
HIH18182B	3929	3931	3933	3935	3937	3939	3941	3943
HIH18183B	3945	3947	3949	3951	3953	3955	3957	3959
HIH18184B	3961	3963	3965	3967	3969	3971	3973	3975
HIH18185B	3977	3979	3981	3983	3985	3987	3989	3991
HIH18186B	3993	3995	3997	3999	4001	4003	4005	4007
HIH18187B	4009	4011	4013	4015	4017	4019	4021	4023
HIH18188B	4025	4027	4029	4031	4033	4035	4037	4039
HIH18189B	4041	4043	4045	4047	4049	4051	4053	4055
HIH18190B	4057	4059	4061	4063	4065	4067	4069	4071
HIH18191B	4073	4075	4077	4079	4081	4083	4085	4087
HIH18192B	4089	4091	4093	4095	4097	4099	4101	4103



## 036953

HIH18193B	4105	4107	4109	4111	4113	4115	4117	4119
HIH18194B	4121	4123	4125	4127	4129	4131	4133	4135
HIH18195B	4137	4139	4141	4143	4145	4147	4149	4151
HIH18196B	4153	4155	4157	4159	4161	4163	4165	4167
HIH18197B	4169	4171	4173	4175	4177	4179	4181	4183
HIH18198B	4185	4187	4189	4191	4193	4195	4197	4199
HIH18199B	4201	4203	4205	4207	4209	4211	4213	4215
HIH18200B	4217	4219	4221	4223	4225	4227	4229	4231
HIH18201B	4233	4235	4237	4239	4241	4243	4245	4247
HIH18202B	4249	4251	4253	4255	4257	4259	4261	4263
HIH18203B	4265	4267	4269	4271	4273	4275	4277	4279
HIH18204B	4281	4283	4285	4287	4289	4291	4293	4295
HIH18205B	4297	4299	4301	4303	4305	4307	4309	4311
HIH18206B	4313	4315	4317	4319	4321	4323	4325	4327
HIH18207B	4329	4331	4333	4335	4337	4339	4341	4343
HIH18208B	4345	4347	4349	4351	4353	4355	4357	4359
HIH18209B	4361	4363	4365	4367	4369	4371	4373	4375
HIH18210B	4377	4379	4381	4383	4385	4387	4389	4391
HIH18211B	4393	4395	4397	4399	4401	4403	4405	4407
HIH18212B	4409	4411	4413	4415	4417	4419	4421	4423
HIH18213B	4425	4427	4429	4431	4433	4435	4437	4439
HIH18214B	4441	4443	4445	4447	4449	4451	4453	4455
HIH18216B	4457	4459	4461	4463	4465	4467	4469	4471
HIH18217B	4473	4475	4477	4479	4481	4483	4485	4487
HIH18218B	4489	4491	4493	4495	4497	4499	4501	4503
HIH18219B	4505	4507	4509	4511	4513	4515	4517	4519
HIH18220B	4521	4523	4525	4527	4529	4531	4533	4535
HIH18221B	4537	4539	4541	4543	4545	4547	4549	4551
HIH18222B	4553	4555	4557	4559	4561	4563	4565	4567
HIH18223B	4569	4571	4573	4575	4577	4579	4581	4583
HIH18224B	4585	4587	4589	4591	4593	4595	4597	4599
HIH18225B	4601	4603	4605	4607	4609	4611	4613	4615
HIH18226B	4617	4619	4621	4623	4625	4627	4629	4631
HIH18227B	4633	4635	4637	4639	4641	4643	4645	4647
HIH18228B	4649	4651	4653	4655	4657	4659	4661	4663
HIH18229B	4665	4667	4669	4671	4673	4675	4677	4679
HIH18230B	4681	4683	4685	4687	4689	4691	4693	4695
HIH18231B	4697	4699	4701	4703	4705	4707	4709	4711
HIH18232B	4713	4715	4717	4719	4721	4723	4725	4727
HIH18233B	4729	4731	4733	4735	4737	4739	4741	4743
HIH18234B	4745	4747	4749	4751	4753	4755	4757	4759
HIH18235B	4761	4763	4765	4767	4769	4771	4773	4775
HIH18236B	4777	4779	4781	4783	4785	4787	4789	4791
HIH18237B	4793	4795	4797	4799	4801	4803	4805	4807
HIH18238B	4809	4811	4813	4815	4817	4819	4821	4823
HIH18239B	4825	4827	4829	4831	4833	4835	4837	4839
HIH18240B	4841	4843	4845	4847	4849	4851	4853	4855
HIH18241B	4857	4859	4861	4863	4865	4867	4869	4871
HIH18242B	4873	4875	4877	4879	4881	4883	4885	4887
HIH18243B	4889	4891	4893	4895	4897	4899	4901	4903
HIH18244B	4905	4907	4909	4911	4913	4915	4917	4919
HIH18245B	4921	4923	4925	4927	4929	4931	4933	4935
HIH18246B	4937	4939	4941	4943	4945	4947	4949	4951
HIH18247B	4953	4955	4957	4959	4961	4963	4965	4967
HIH18248B	4969	4971	4973	4975	4977	4979	4981	4983
HIH18249B	4985	4987	4989	4991	4993	4995	4997	4999
HIH18250B	5001	5003	5005	5007	5009	5011	5013	5015
HIH18251B	5017	5019	5021	5023	5025	5027	5029	5031
HIH18252B	5033	5035	5037	5039	5041	5043	5045	5047
HIH18253B	5049	5051	5053	5055	5057	5059	5061	5063
HIH18254B	5065	5067	5069	5071	5073	5075	5077	5079
HIH18255B	5081	5083	5085	5087	5089	5091	5093	5095
HIH18256B	5097	5099	5101	5103	5105	5107	5109	5111
HIH18257B	5113	5115	5117	5119	5121	5123	5125	5127
HIH18258B	5129	5131	5133	5135	5137	5139	5141	5143
HIH18259B	5145	5147	5149	5151	5153	5155	5157	5159
HIH18261B	5161	5163	5165	5167	5169	5171	5173	5175
HIH18262B	5177	5179	5181	5183	5185	5187	5189	5191
HIH18263B	5193	5195	5197	5199	5201	5203	5205	5207
HIH18264B	5209	5211	5213	5215	5217	5219	5221	5223

## 036953

HIH18265B	5225	5227	5229	5231	5233	5235	5237	5239
HIH18266B	5241	5243	5245	5247	5249	5251	5253	5255
HIH18267B	5257	5259	5261	5263	5265	5267	5269	5271
HIH18268B	5273	5275	5277	5279	5281	5283	5285	5287
HIH18269B	5289	5291	5293	5295	5297	5299	5301	5303
HIH18270B	5305	5307	5309	5311	5313	5315	5317	5319
HIH18271B	5321	5323	5325	5327	5329	5331	5333	5335
HIH18272B	5337	5339	5341	5343	5345	5347	5349	5351
HIH18274B	5353	5355	5357	5359	5361	5363	5365	5367
HIH18275B	5369	5371	5373	5375	5377	5379	5381	5383
HIH18276B	5385	5387	5389	5391	5393	5395	5397	5399
HIH18277B	5401	5403	5405	5407	5409	5411	5413	5415
HIH18278B	5417	5419	5421	5423	5425	5427	5429	5431
HIH18279B	5433	5435	5437	5439	5441	5443	5445	5447
HIH18280B	5449	5451	5453	5455	5457	5459	5461	5463
HIH18281B	5465	5467	5469	5471	5473	5475	5477	5479
HIH18282B	5481	5483	5485	5487	5489	5491	5493	5495
HIH18283B	5497	5499	5501	5503	5505	5507	5509	5511
HIH18284B	5513	5515	5517	5519	5521	5523	5525	5527
HIH18285B	5529	5531	5533	5535	5537	5539	5541	5543
HIH18286B	5545	5547	5549	5551	5553	5555	5557	5559
HIH18287B	5561	5563	5565	5567	5569	5571	5573	5575
HIH18288B	5577	5579	5581	5583	5585	5587	5589	5591
HIH18289B	5593	5595	5597	5599	5601	5603	5605	5607
HIH18290B	5609	5611	5613	5615	5617	5619	5621	5623
HIH18291B	5625	5627	5629	5631	5633	5635	5637	5639
HIH18292B	5641	5643	5645	5647	5649	5651	5653	5655
HIH18293B	5657	5659	5661	5663	5665	5667	5669	5671
HIH18294B	5673	5675	5677	5679	5681	5683	5685	5687
HIH18295B	5689	5691	5693	5695	5697	5699	5701	5703
HIH18297B	5705	5707	5709	5711	5713	5715	5717	5719
HIH18298B	5721	5723	5725	5727	5729	5731	5733	5735
HIH18299B	5737	5739	5741	5743	5745	5747	5749	5751
HIH18300B	5753	5755	5757	5759	5761	5763	5765	5767
HIH18301B	5769	5771	5773	5775	5777	5779	5781	5783
HIH18302B	5785	5787	5789	5791	5793	5795	5797	5799
HIH18303B	5801	5803	5805	5807	5809	5811	5813	5815
HIH18304B	5817	5819	5821	5823	5825	5827	5829	5831
HIH18305B	5833	5835	5837	5839	5841	5843	5845	5847
HIH18306B	5849	5851	5853	5855	5857	5859	5861	5863
HIH18307B	5865	5867	5869	5871	5873	5875	5877	5879
HIH18308B	5881	5883	5885	5887	5889	5891	5893	5895
HIH18309B	5897	5899	5901	5903	5905	5907	5909	5911
HIH18310B	5913	5915	5917	5919	5921	5923	5925	5927
HIH18311B	5929	5931	5933	5935	5937	5939	5941	5943
HIH18312B	5945	5947	5949	5951	5953	5955	5957	5959
HIH18313B	5961	5963	5965	5967	5969	5971	5973	5975
HIH18314B	5977	5979	5981	5983	5985	5987	5989	5991
HIH18315B	5993	5995	5997	5999	6001	6003	6005	6007
HIH18316B	6009	6011	6013	6015	6017	6019	6021	6023
HIH18317B	6025	6027	6029	6031	6033	6035	6037	6039
HIH18318B	6041	6043	6045	6047	6049	6051	6053	6055
HIH18319B	6057	6059	6061	6063	6065	6067	6069	6071
HIH18320B	6073	6075	6077	6079	6081	6083	6085	6087
HIH18321B	6089	6091	6093	6095	6097	6099	6101	6103
HIH18322B	6105	6107	6109	6111	6113	6115	6117	6119
HIH18323B	6121	6123	6125	6127	6129	6131	6133	6135
HIH18324B	6137	6139	6141	6143	6145	6147	6149	6151
HIH18325B	6153	6155	6157	6159	6161	6163	6165	6167
HIH18326B	6169	6171	6173	6175	6177	6179	6181	6183
HIH18327B	6185	6187	6189	6191	6193	6195	6197	6199
HIH18328B	6201	6203	6205	6207	6209	6211	6213	6215
HIH18329B	6217	6219	6221	6223	6225	6227	6229	6231
HIH18330B	6233	6235	6237	6239	6241	6243	6245	6247
HIH18331B	6249	6251	6253	6255	6257	6259	6261	6263
HIH18332B	6265	6267	6269	6271	6273	6275	6277	6279
HIH18333B	6281	6283	6285	6287	6289	6291	6293	6295
HIH18334B	6297	6299	6301	6303	6305	6307	6309	6311
HIH18335B	6313	6315	6317	6319	6321	6323	6325	6327

Пример 9. H1N1729P обладает лучшим фармакокинетическим профилем у мышей и отличных от человека приматов (NHP) по сравнению с антителом сравнения (mAb контроля I).

Исследование выполняли для сравнения фармакокинетического профиля H1N1729P с антителом сравнения у мышей и отличных от человека приматов. Одним антителом сравнения против HA вируса гриппа, разрабатываемым в настоящем документе в качестве mAb контроля I, является антитело против HA вируса гриппа с аминокислотными последовательностями тяжелой (HC) и легкой (LC) цепей, представленное в WO 2008/028946 как SEQ ID NO: 65 (HC) и SEQ ID NO: 91 (LC), а также названное в WO 2008/028946 CR6261.

В РК экспериментах как с мышью, так и с NHP определяли уровни циркулирующего лекарственного средства с помощью анализа общего человеческого антитела с использованием иммуноанализа ELISA. Вкратце, поликлональным антителом козы против IgG человека покрывали 96-луночные планшеты для захвата тестируемых человеческих антител в сыворотке крови, а затем выявляли связанные с планшетом антитела с использованием поликлонального антитела козы против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена и TMB субстратом. Использовали образцы сыворотки крови в шестидозовых серийных разведениях, а эталонные стандарты соответствующих антител в 12-дозовых серийных разведениях. Концентрации лекарственного антитела в сыворотке крови вычисляли на основании кривых, созданных по эталонному стандарту с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

#### А. Исследование на мыши.

Фармакокинетическое оценивание H1N1729P выполняли на мышах C57BL/6 дикого типа (WT). H1N1729P и mAb контроля I вводили SC в отдельных группах из 5 мышей каждая дозой 1 мг/кг. Кровь собирали через 6 ч, 1, 2, 3, 4, 7, 11, 14, 22 и 30 суток после инъекции в дополнение к крови, собранной за одни сутки до инъекции антител (перед кровопусканием). Сывороточные фракции разделяли и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа.

#### Результаты.

Как показано в табл. 14, период полувыведения H1N1729P у мышей WT составлял 11,1 суток, тогда как период полувыведения mAb контроля I составлял 5,67 суток, что демонстрировало преимущество H1N1729P над антителом сравнения.

Таблица 14

Краткое описание фармакокинетических профилей H1N1729P и mAb контроля I у неинфицированных мышей дикого типа

Лекарственное средство	$T_{1/2}$ (сутки)	С <sub>max</sub> (мкг/мл)	AUC (сутки* мкг/мл)
H1N1729P	11,1 ± 0,8	12,0 ± 0,9	147 ± 3,4
mAb контроля I	5,67 ± 0,6	10,4 ± 0,6	93,8 ± 4,8

#### В. NHP яванские макаки.

Оценивание фармакокинетической скорости выведения H1N1729P и mAb контроля I проводили на 3-5-летних самках яванских макаков. Обезьян предварительно исследовали на предмет антител вируса гриппа А и В антитела и признавали негативными. Антитело тестировали на трех животных и вводили подкожно дозой 3 мг/кг (с объемом 2 мл/кг и 1,5 мг/мл). Собирали образцы крови до введения дозы и после инъекции через 1, 4, 8 ч и в дни 1, 2, 3, 4, 5, 10, 14, 18, 21, 24, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 84 и 98. Сыворотку крови выделяли из цельной крови и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до анализа. Концентрации циркулирующего лекарственного средства определяли с помощью анализа общего человеческого антитела с использованием иммуноанализа ELISA. Концентрации лекарственного антитела в сыворотке крови вычисляли на основании кривых, созданных по эталонному стандарту с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

#### Результаты.

Как показано в табл. 15, период полувыведения H1N1729P у обезьян составлял 13,4 суток, тогда как период полувыведения mAb контроля I составлял 8,05 суток, что демонстрировало преимущество H1N1729P над антителом сравнения.

Таблица 15

Краткое описание фармакокинетических профилей H1N1729P и mAb контроля I у яванских макаков

Лекарственное средство	$T_{1/2}$ (сутки)	С <sub>max</sub> (мкг/мл)	AUC (сутки* мкг/мл)
H1N1729P	13,4 ± 1,46	41,3 ± 7,84	863 ± 145
mAb контроля I	8,05 ± 2,17	24,9 ± 1,87	320 ± 70,1

Пример 10. H1N1729P эффективно лечит летальную инфекцию вируса гриппа у мышей.

Существует острая неудовлетворенная потребность в улучшении стандарта терапии для лечения или предупреждения инфекций вируса гриппа у людей. На сегодняшний день имеется только два класса лекарственных средств: адамантаны и ингибиторы нейраминидазы (NAI). Адамантаны (амантадин и ри-

мантадин) были ассоциированы с быстрым появлением устойчивых к лекарственному средству штаммов и больше не рекомендуются для лечения гриппа. NAI, такие как осельтамивир (TAMIFLU®), являются лекарственными средствами первой линии для лечения и профилактики гриппа, однако, их окно эффективности ограничено: NAI, как было показано, уменьшают продолжительность симптомов лихорадки и болезни примерно на одни сутки в терапевтическом плане, если противовирусное средство вводить в течение 48 ч после появления симптомов с небольшими клиническими доказательствами эффективности при введении через 48 ч.

Для оценивания *in vivo* эффективности H1N1729P в лечении тяжелого гриппа выполняли эксперименты со следующими целями.

Исследование 1: для оценки эффективности однократной дозы H1N1729P по сравнению с клиническим стандартом лечения осельтамивиром (TAMIFLU®), назначаемым два раза в сутки в течение 5 суток.

Исследование 2: для определения эффективности H1N1729P, вводимого в комбинации с осельтамивиром.

Штамм, используемый в данных исследованиях, включал в себя исторический изолят вируса гриппа А группы 1 [A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)]. Все эксперименты выполняли на самках мышей дикого типа (BALB/c) возрастом 6 недель. Мышей сенсibilизировали с помощью 10× мышшиной LD<sub>50</sub> (MLD<sub>50</sub>), что эквивалентно 800 бляшкообразующим единицам (PFU), A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1). В моделях лечения мышей сенсibilизировали интраназально (IN) в день 0 после инфицирования (*p.i.*) и фиксированные дозы mAb давали внутривенно (IV) в определенные дни после инфицирования (например, в дни 1, 2, 3, 4 или 5). Осельтамивир повторно суспендировали согласно инструкциям изготовителя и мышам вводили дозу каждые 12 ч (т.е. два раза в сутки; BID) пероральным путем принудительно через желудочный зонд в течение 5 суток, при этом первую дозу вводили в день 2 или 3 после инфицирования. Мышей взвешивали и обследовали ежедневно до дня 14 *p.i.* и умерщвляли при потере ими >20% их изначально исходной массы. Результаты регистрировали как выживаемость в процентах.

В первом эксперименте исследовали эффективность либо однократной дозы H1N1729P (15 мг/кг), либо 25 или 5 мг/кг осельтамивира BID (5-суточный режим), начиная через 48 ч после инфицирования (т.е. вводимых с терапевтической целью), для оценивания эффекта на мышшиной модели в данный момент времени. Все мыши, получавшие 5 мг/кг осельтамивира, умирали ко дню 6, тогда как доза 25 мг/кг улучшала выживаемость до 40%; для сравнения, все мыши, получавшие H1N1729P, выживали (фиг. 1 и табл. 16).

В следующем эксперименте H1N1729P тестировали в комбинации с осельтамивиром, начиная через 72 ч после инфицирования. Тогда как только приблизительно 20% мышшей, обрабатываемых с 25 мг/кг осельтамивира, выживали, однократные дозы H1N1729P 15 и 7 мг/кг приводили к 60 и 36% выживаемости соответственно. Наблюдали аддитивный эффект при объединении обработок: однократная доза 7 мг/кг H1N1729P, объединенная с режимом осельтамивира, демонстрировала 60% выживаемость, а однократная доза 15 мг/кг H1N1729P в комбинации с режимом осельтамивира, давала 87% выживаемость (фиг. 2 и табл. 17).

Таким образом, H1N1729P показывало высокую эффективность в лечении мышшей, инфицированных историческим штаммом вируса тяжелого гриппа, и на самом деле демонстрировало более высокую эффективность, чем осельтамивир, через 48 ч после инфицирования. Кроме того, H1N1729P демонстрировало аддитивную эффективность при введении в комбинации с осельтамивиром.

Таблица 16

Результаты исследования 1: однократная доза H1N1729P через 48 ч *p.i.* демонстрирует более высокую эффективность, чем осельтамивир через 48 ч *p.i.*, при лечении тяжелой инфекции вируса гриппа А у мышшей

PID	Число мышшей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышшей/общее число мышшей в группе)
Перорально введенный принудительно через желудочный зонд контроль (неинфицированные)	5	100 (5/5)
H1N1729P	5	100 (5/5)
Осельтамивир (25 мг/кг BID x 5 суток)	5	40 (2/5)
Осельтамивир (5 мг/кг BID x 5 суток)	5	0 (0/5)
Отрицательный контроль изотипа h1gG1	5	0 (0/5)
Перорально введенный принудительно через желудочный зонд контроль (инфицированные)	5	0 (0/5)

Таблица 17

Результаты исследования 2: аддитивную эффективность наблюдали при однократной дозе Н1Н1729Р, объединенного с осельтамивиром, через 72 ч р.і. при лечении тяжелого гриппа у мышей

РІD	Число мышей на группу	Выживаемость в процентах (число выживших мышей/общее число мышей в группе)
Н1Н1729Р (15 мг/кг)	15	60 (9/15)
Н1Н1729Р (7 мг/кг)	15	35,7 (5/15)
Н1Н1729Р (15 мг/кг) + осельтамивир (25 мг/кг BID x 5 суток)	15	86,7 (13/15)
Н1Н1729Р (7 мг/кг) + осельтамивир (25 мг/кг BID x 5 суток)	15	60 (9/15)
Осельтамивир (25 мг/кг BID x 5 суток)	15	20 (3/15)
Отрицательный контроль изотипа hlgG1	15	0 (0/15)
Перорально введенный принудительно через желудочный зонд контроль (инфицированные)	15	0 (0/15)

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) вируса гриппа А, содержащее определяющие комплементарность участки (CDR) в пределах пары аминокислотных последовательностей варибельного участка тяжелой цепи/варибельного участка легкой цепи (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 18/26 и 50/66.

2. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют полупериод диссоциации у обезьян, который приблизительно в 1,5 раза превышает таковой mAb контроля I, и полупериод диссоциации у мышей, который приблизительно в 2 раза превышает таковой mAb контроля I.

3. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют усиление защиты у инфицированного вирусом гриппа млекопитающего относительно осельтамивира при введении через 48 ч после инфицирования.

4. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют усиление защиты при введении инфицированному вирусом гриппа млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы приблизительно 15 мг/кг относительно перорального введения осельтамивира, вводимого два раза в сутки в течение 5 суток дозой от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг/кг.

5. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют показатель выживаемости приблизительно 100% у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении в виде однократной дозы приблизительно 15 мг/кг через 48 ч после инфицирования.

6. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют показатель выживаемости приблизительно 100% у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении в виде однократной дозы приблизительно 15 мг/кг.

7. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют аддитивный защитный эффект у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении с осельтамивиром через 72 ч после инфицирования.

8. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют аддитивный защитный эффект при использовании в комбинации с осельтамивиром при введении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде однократной внутривенной дозы, варьирующей от приблизительно 7 до приблизительно 15 мг/кг, и при введении осельтамивира перорально два раза в сутки в течение 5 суток дозой приблизительно 25 мг/кг.

9. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, содержащие HCVR, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 50.

10. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, содержащие LCVR, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 26 и 66.

11. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, содержащие:

(a)

HCDR1, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20;  
HCDR2, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22;  
HCDR3, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24;  
LCDR1, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28;  
LCDR2, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30; и  
LCDR3, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; или

(b)

HCDR1, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52;  
HCDR2, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54;  
HCDR3, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56;  
LCDR1, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68;  
LCDR2, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; и  
LCDR3, включающий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72.

12. Выделенное рекомбинантное антитело или его антиген связывающий фрагмент по п.11, содержащие: (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 20, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 22; (c) HCDR3 из SEQ ID NO: 24; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 28; (e) LCDR2 из SEQ ID NO: 30 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO:32.

13. Выделенное рекомбинантное антитело или его антиген связывающий фрагмент по п.11, содержащие: (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 52, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 54; (c) HCDR3 из SEQ ID NO: 56; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 68; (e) LCDR2 из SEQ ID NO: 70 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 72.

14. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 и 50/66.

15. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, при этом антитело предупреждает прикрепление вируса гриппа к клетке-хозяину и/или вхождение такового в клетку-хозяина.

16. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, содержащие HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26.

17. Выделенное рекомбинантное антитело по п.16, которое представляет собой IgG1 антитело или IgG4 антитело.

18. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, содержащие HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66.

19. Выделенное рекомбинантное антитело по п.18, которое представляет собой IgG1 антитело или IgG4 антитело.

20. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является полностью человеческим моноклональным антителом.

21. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с HA вируса гриппа с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-9}$  M, как измерено биосенсором на основе интерферометра в биослое в режиме реального времени (анализ Octet HTX).

22. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют полупериод диссоциации ( $t^{1/2}$ ) более 370 мин.

23. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют нейтрализацию вирусов гриппа А группы 1, выбранных из H1N, H5N1, H9N2, H13N6 и H16N3, с  $IC_{50}$  менее 130 нМ.

24. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют опосредованный комплементом лизис инфицированных вирусом гриппа клеток с  $EC_{50}$  менее 66 нМ.

25. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-24, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают защиту от гриппа, как измерено с помощью повышения выживаемости на животной модели инфекции вируса после введения выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента либо до, либо после заражения вирусом по сравнению с животной моделью без указанного введения.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с HA вируса гриппа, по любому из

пп.1-25 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, содержащая одно или несколько антител, имеющих пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 и 50/66.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая: (а) первое выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-25, которые связываются с НА вируса гриппа по первому эпитопу; (b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с НА вируса гриппа по второму эпитопу, и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

29. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-25.

30. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-25.

31. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.29 или 30.

32. Клетка, продуцирующая антитело, содержащая вектор экспрессии по п.31.

33. Способ предупреждения, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа, при этом способ предусматривает введение выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-25 или фармацевтической композиции по любому из пп.26-28 субъекту при необходимости этого.

34. Способ по п.33, при котором по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, кашля, болей в теле, ринореи, затруднения дыхания, пневмонии или бронхита.

35. Способ по п.33, при котором фармацевтическую композицию вводят профилактически субъекту при необходимости этого.

36. Способ по п.35, при котором фармацевтическую композицию вводят профилактически субъекту, выбранному из группы, состоящей из индивидуума с ослабленным иммунитетом, пожилого человека (возрастом старше 65 лет), медработника и человека, имеющего нарушения в анамнезе или основное состояние заболевания, например заболевания сердца и сахарный диабет.

37. Способ по любому из пп.33-36, при котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства, антитела против НА вируса гриппа, вакцины против гриппа и пищевой добавки.

38. Способ по п.37, при котором второе терапевтическое средство представляет собой противовоспалительное лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из кортикостероида и нестероидного противовоспалительного лекарственного средства.

39. Способ по п.37, при котором второе терапевтическое средство вводят путем введения, отличающимся от пути введения выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-25 или фармацевтической композиции по любому из пп.26-28.

40. Способ по п.39, при котором второе терапевтическое средство вводят перорально.

41. Способ по п.37, при котором противовирусным лекарственным средством является осельтамивир.

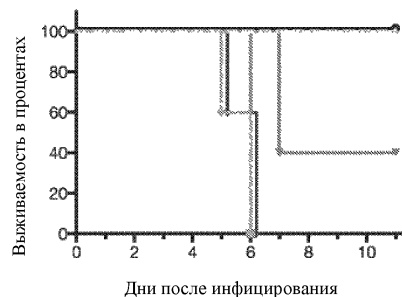
42. Способ по п.41, при котором осельтамивир вводят одновременно с введением антитела.

43. Способ по любому из пп.33-42, при котором фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально или перорально.

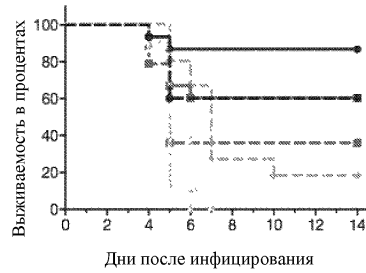
44. Способ по любому из пп.33-42, при котором субъект имеет инфекцию гриппа.

45. Способ по п.37, где вторым терапевтическим средством является пищевая добавка, которая представляет собой антиоксидант.

46. Способ по любому из пп.33-36, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации с паллиативной терапией для лечения инфекции гриппа.



Фиг. 1



Фиг. 2

<b>SEQ ID NO: 18 H1H11729F-HCVR</b> Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gln Pro Val Tyr Gln Tyr Asn Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
<b>SEQ ID NO: 20 H1H11729F-HCDR1</b> Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
<b>SEQ ID NO: 22 H1H11729F-HCDR2</b> Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro
<b>SEQ ID NO: 24 H1H11729F-HCDR3</b> Ala Arg Gln Gln Pro Val Tyr Gln Tyr Asn Met Asp Val
<b>SEQ ID NO: 26 H1H11729F-LCVR</b> Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Leu Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
<b>SEQ ID NO: 28 H1H11729F-LCDR1</b> Gln Gly Ile Arg Asn Asn
<b>SEQ ID NO: 30 H1H11729F-LCDR2</b> Ala Ala Ser
<b>SEQ ID NO: 32 H1H11729F-LCDR3</b> Leu Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Trp Thr

Фиг. 3

<b>SEQ ID NO: 50 H1H11829N2-HCVR</b> Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Val Thr Phe Ile Ser His Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly Gly Ile Ile Ala Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Thr Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Thr Tyr Tyr Glu Gly Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
<b>SEQ ID NO: 52 H1H11829N2-HCDR1</b> Gly Val Thr Phe Ile Ser His Ala
<b>SEQ ID NO: 54 H1H11829N2-HCDR2</b> Ile Ile Ala Ile Phe Gly Thr Thr
<b>SEQ ID NO: 56 H1H11829N2-HCDR3</b> Ala Arg Gly Glu Thr Tyr Tyr Glu Gly Asn Phe Asp Phe
<b>SEQ ID NO: 66 H1H11829N2-LCVR</b> Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
<b>SEQ ID NO: 68 H1H11829N2-LCDR1</b> Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
<b>SEQ ID NO: 70 H1H11829N2-LCDR2</b> Ala Ala Ser
<b>SEQ ID NO: 72 H1H11829N2-LCDR3</b> Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

Фиг. 4

