

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038470**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.01

(21) Номер заявки
201692192

(22) Дата подачи заявки
2015.04.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С FcRn АНТИТЕЛО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **61/986,742**

(32) **2014.04.30**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/KR2015/004424**

(87) **WO 2015/167293 2015.11.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАНОЛ БИОФАРМА КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Ким Сунк Вук, Пак Сынк Кук, Чонк Чэ Капх, Ан Хйэ Кёнк, Ким Мин Сун, Ким Ын Сун, Ёнк Хэ-Ёнк, Син Тонкок, Сонк Ён Чунк, Ю Тэ Хёнк (KR)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **US-A1-20070092507**

CHRISTIANSON et al., 'Monoclonal antibodies directed against human FcRn and their applications' MAb, Vol. 4, Issue No. 2, pp. 208-216 (2012) See abstract and figure 1

SCHWAB et al., 'Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system?' Nature Reviews Immunology, Vol. 13, No. 3, pp. 176-189 (Epub. 15 February 2013) See abstract and pages 177 and 181

RATH et al., 'The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG' Journal of Clinical Immunology, Vol. 33, Supplement No. 1, pp. S9-S17 (Epub. 05 September 2012) See abstract and page S10

PRAETOR et al., 'beta2-microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn' Journal of Cell Science, Vol. 115, No. 11, pp. 2389-2397 (2002) See abstract

(57) Изобретение относится к выделенному анти-FcRn антителу, которое представляет собой антитело, связывающееся с FcRn (расшифровывается как неонатальный Fc-рецептор, также называемый FcRP, FcRB или рецептор Брамбелла), который является рецептором с высокой аффинностью к IgG или его фрагменту, к способу его получения, к композиции для лечения аутоиммунного заболевания, которая включает антитело, и к способу лечения и диагностики аутоиммунных заболеваний с использованием антитела. FcRn-специфическое антитело в соответствии с настоящим изобретением связывается с FcRn неконкурентно с IgG для снижения уровней сывороточных патогенных аутоантител и, таким образом, может быть использовано для лечения аутоиммунных заболеваний.

B1**038470****038470****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к выделенному анти-FcRn антителу, которое представляет собой антитело, связывающееся с FcRn (расшифровывается как неонатальный Fc-рецептор, также называемый FcRP, FcRB или рецептор Брамбелла), который является рецептором с высокой аффинностью к IgG или его фрагменту, к способу его получения, к композиции для лечения аутоиммунного заболевания, которая содержит антитело, и к способу лечения и диагностики аутоиммунных заболеваний с использованием антитела. FcRn-специфическое антитело в соответствии с настоящим изобретением связывается с FcRn неконкурентно с IgG, снижая сывороточные уровни патогенных аутоантител, и, таким образом, может быть использовано для лечения аутоиммунных заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Антитела представляют собой иммунологические белки, которые связываются со специфическим антигеном. В большинстве животных, включая людей и мышей, антитела построены из спаренных тяжелых и легких полипептидных цепей, и каждая цепь состоит из двух различных областей, называемых вариабельные и константные области. Вариабельные области легких и тяжелых цепей демонстрируют значительное разнообразие последовательности между антителами и отвечают за связывание антигенами. Константные области демонстрируют меньшее разнообразие последовательностей и отвечают за связывание ряда природных белков, вызывая важные биохимические явления.

В нормальных условиях период полужизни в сыворотке большинства IgG, за исключением изотипа IgG3, составляет около 22-23 дней в организме человека, что является пролонгированным периодом по сравнению с периодом полужизни в сыворотке других белков плазмы. Что касается этого пролонгированного периода полужизни IgG в сыворотке, то IgG, которые проникают в клетку путем эндоцитоза, могут сильно связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn, род γ -Fc-рецептора) в эндосомах при pH 6,0, тем самым избегая деградирующего лизосомального пути. Когда комплекс IgG-FcRn возвращается к плазматической мембране, IgG быстро диссоциирует из FcRn в кровоток при слабощелочном pH (~7,4). Этим опосредованным рецептором механизмом кругооборота FcRn эффективно спасает IgG от деградации в лизосомах, тем самым продлевая период полужизни IgG (Roopenian et al. J. Immunol. 170:3528, 2003).

FcRn был идентифицирован в неонатальном кишечнике крыс, где он функционирует в качестве посредника поглощения антитела IgG из молока матери и облегчает его транспортировку в кровеносную систему. FcRn был также выделен из плаценты человека, где он опосредует абсорбцию и транспорт материнских IgG в кровоток плода. У взрослых FcRn экспрессируется в ряде тканей, в том числе эпителиальных тканях легкого, толстой кишки, почек, и назальных, вагинальных поверхностей и поверхностей желчных протоков.

FcRn является нековалентным гетеродимером, который обычно находится в эндосомах эндотелиальных и эпителиальных клеток. FcRn представляет собой связанный с мембраной рецептор, имеющий три α -домена тяжелой цепи ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$) и один растворимый домен легкой цепи, $\beta 2$ -микроглобулин ($\beta 2m$). Структурно он принадлежит к семейству молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го класса, которые имеют $\beta 2m$ в качестве общей легкой цепи. FcRn цепь имеет молекулярную массу около 46 кДа и состоит из эктодомена, содержащего домены $\alpha 1$, $\alpha 2$, и $\alpha 3$ тяжелой цепи и домен $\beta 2m$ легкой цепи и включает одну сахарную цепь, однократно проходит через мембрану и имеет сравнительно короткий цитоплазматический хвост.

Для изучения вклада FcRn в гомеостаз IgG были созданы мыши, у которых по меньшей мере часть из генов, кодирующих $\beta 2m$ и тяжелые цепи FcRn, были "нокаутированы" для того, чтобы эти белки не экспрессировались. В этих мышцах время полужизни в сыворотке и концентрация IgG были значительно снижены, что указывает на FcRn-зависимый механизм гомеостаза IgG. Кроме того, было предположено, что антитела против FcRn человека могут быть получены в этих нокаутных по FcRn мышцах, и что эти антитела могут предотвратить связывание IgG с FcRn. Ингибирование связывания IgG с FcRn отрицательно изменяет период полужизни IgG в сыворотке, предотвращая рециркуляцию IgG, что позволяет лечить аутоиммунные заболевания, вызываемые аутоантителами. Эта возможность была продемонстрирована в мышинной модели аутоиммунных кожных буллезных заболеваний (Li et al. J. Clin. Invest. 115:3440, 2005). Соответственно, агенты, которые блокируют или противодействуют связыванию IgG с FcRn, могут быть использованы в способе лечения или профилактики аутоиммунных и воспалительных заболеваний, которые опосредованы IgG.

"Аутоиммунные заболевания" охватывают болезни, которые возникают, когда иммунная система организма атакует свои собственные здоровые ткани, органы или другие компоненты *in vivo* из-за системных нарушений иммунной системы, причина которых не может быть найдена. Эти аутоиммунные заболевания являются системными заболеваниями, которые могут возникнуть практически во всех частях тела, в том числе в нервной системе, желудочно-кишечном тракте, эндокринной системе, коже, костной системе и сосудистой ткани. Известно, что от аутоиммунных заболеваний страдают около 5-8% населения земного шара, но по имеющимся данным распространенность аутоиммунных заболеваний ниже, чем фактический уровень, из-за недопонимания аутоиммунных заболеваний и ограничений способа ди-

агностики этих заболеваний.

Причины аутоиммунных заболеваний изучались в течение длительного периода времени с точки зрения генетических, экологических и иммунологических факторов, но все еще не были четко определены. Многие недавние исследования показали, что ряд аутоиммунных заболеваний вызван аутоантителами IgG-типа. В самом деле, соотношение между наличием или отсутствием специфичных к заболеванию аутоантител и лечение аутоиммунных заболеваний в значительной мере определены из исследований заболеваний и при лечении аутоиммунных заболеваний. Таким образом, наличие специфичных к заболеванию аутоантител и патологическая их роль в большом числе аутоиммунных заболеваний были идентифицированы, и в случае удаления из крови представляющих интерес аутоантител может быть достигнут эффект быстрого излечения заболевания.

Аутоиммунные заболевания и аллоиммунные заболевания опосредованы патогенными антителами, и их типичные примеры включают иммунную нейтропению, синдром Гийена-Барре, эпилепсию, аутоиммунный энцефалит, синдром Исаака, синдром невуса, пузырчатку обыкновенную, эксфолиативную пузырчатку, буллезный пемфигоид, приобретённый буллезный эпидермолиз, пемфигоид беременных, пузырчатку слизистой оболочки, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную анемию, аутоиммунную базедову болезнь, синдром Гудпасчера, тяжелую псевдопаралитическую миастению, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, волчанку, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), волчаночный нефрит или мембранозную нефропатию и т.п.

Например, известно, что в случае тяжелой псевдопаралитической миастении (MG), рецептор ацетилхолина (AChR), расположенный в нервно-мышечном соединении произвольных мышц уничтожается или блокируется аутоантителами против рецептора, что приводит к нарушению работы сокращающихся мышц. Кроме того, известно, что при уменьшении количества таких аутоантител функция мышц восстанавливается.

Как и в случае ИТП, ИТП представляет собой заболевание, вызванное разрушением периферических тромбоцитов из-за генерации аутоантител, которые связываются со специфическим мембранным гликопротеином тромбоцитов. Антитромбоцитарные антитела опсонизируют тромбоциты и приводят к быстрому разрушению тромбоцитов ретикулярными клетками (например, макрофагами).

В общем, попытки лечения ИТП включают подавление иммунной системы и, следовательно, приводят к увеличению уровней тромбоцитов. ИТП поражает женщин чаще, чем мужчин, и чаще встречается у детей, чем у взрослых. Заболеваемость составляет 1 на 10000 человек. Хроническая ИТП является одним из основных заболеваний крови у взрослых и детей. Эта патология является источником значительного уровня госпитализации и стоимости лечения в специализированных гематологических отделениях в США и во всем мире. Каждый год насчитывается около 20000 новых случаев в США, а стоимость ухода при ИТП и специальной терапии чрезвычайно высока. Большинство детей с ИТП имеют очень низкое количество тромбоцитов, что вызывает внезапное кровотечение, с типичными симптомами, включающими ушибы, небольшие красные точки на коже, носовые кровотечения и кровоточивость десен. Хотя дети иногда могут восстанавливаться без какого-либо лечения, многие врачи рекомендуют тщательное наблюдение и смягчение кровотечения и лечение с внутривенными вливаниями γ -глобулина.

Известно, что важный элемент патогенеза волчаночного нефрита, вида аутоиммунного заболевания, заключается в повышенном уровне иммунного комплекса, который может появиться из-за несоответствующего перепроизводства аутоантител, таких как антиядерные антитела, который накапливаясь в системных органах вызывает воспалительные реакции. Около 40-70% пациентов с волчанкой имеют поражение почек, и у около 30% всех пациентов развивается волчаночный нефрит, который известен как плохой прогностический фактор у пациентов с волчанкой. Хотя были испробованы способы лечения волчаночного нефрита с использованием иммунодепрессантов, сообщалось, что ремиссия не индуцировалась у 22% больных волчаночным нефритом даже при использовании иммунодепрессантов. Кроме того, сообщалось, что даже когда ремиссия была получена, у 10-65% пациентов возникал рецидив волчаночного нефрита после снижения применения иммунодепрессантов. В конечном счете, 5-10% пациентов с тяжелым волчаночным нефритом умирают через 10 лет (класс III и IV ВОЗ), а 5-15% больных приходят к терминальной стадии почечной стадии. Таким образом, до сих пор не сообщалось об адекватном лечении волчаночного нефрита.

Таким образом, применение антител, участвующих в новом механизме лечения аутоиммунных заболеваний путем очищения от патогенных аутоантител, как ожидается, окажет терапевтический эффект в отношении патогенных IgG-опосредованных аутоиммунных заболеваний, таких как обыкновенная пузырчатка, оптиконевромиелит и тяжелая псевдопаралитическая миастения, и клубочковых заболеваний, опосредованных иммунными комплексами, таких как волчаночный нефрит или мембранозная нефропатия.

Широко использовались способы лечения аутоиммунных заболеваний путем внутривенного введения в больших количествах IgG (IVIg) (Arnson Autoimmunity 42:553, 2009). Эффекты IVTG объясняются различными механизмами, но также объясняются механизмом, который увеличивает клиренс патогенных антител конкуренцией с эндогенными IgG за FcRn. Было показано, что внутривенное введение иммуноглобулина человека (IVIg) в больших количествах увеличивает количества тромбоцитов у детей,

страдающих иммунной ИТР, и IVTG продемонстрировали полезность в качестве средства для лечения некоторых других аутоиммунных состояний. Многие исследования изучали механизмы, с помощью которых IVIG оказывают влияние на лечение аутоиммунных заболеваний. Что касается ИТР, то ранние исследования привели к выводу о том, что IVIG оказывают влияние в основном из-за блокады Fc-рецепторов, ответственных за фагоцитоз антитело-опсонизированных тромбоцитов. Последующие исследования показали, что Fc-истощенные IVIG препараты обеспечивают увеличение количества тромбоцитов у некоторых пациентов с ИТР, а недавно было сообщено, что IVIG оказывает влияние за счет стимуляции экспрессии FcγRIIb в клетках макрофагов, что приводит к угнетению фагоцитоза тромбоцитов.

Тем не менее, такие терапии IVIG имеют значительные побочные эффекты и являются очень дорогостоящими при использовании. Кроме того, другие виды терапии, используемые для лечения аутоиммунных/аллоиммунных состояний, отличных от IVTG, включают поликлональный анти-D иммуноглобулин, кортикостероиды, иммуносупрессанты (включая химиотерапевтические средства), цитокины, плазмаферез, экстракорпоральную адсорбцию антител (например, с использованием колонок Prosorba), оперативные вмешательства, такие как спленэктомия, и другое. Однако подобно IVIG эти методы лечения также осложняются неполной эффективностью и высокой стоимостью. Кроме того, очень высокие дозы IVIG необходимы для получения существенного увеличения клиренса патогенных антител из-за предполагаемого механизма IVIG-ингибирования связыванием FcRn с патогенным антителом (т.е. конкурентным ингибированием) и в связи с тем, что IgG показывает очень низкую аффинность к FcRn при физиологическом pH (т.е. pH 7,2-7,4), а типичная клиническая доза IVTG составляет около 2 г/кг.

Применение ингибитора, который конкурентно ингибирует связывание IgG с FcRn для лечения аутоиммунных заболеваний, является перспективным терапевтическим способом. Тем не менее, благодаря высокому сродству эндогенного IgG к FcRn и высокой концентрации эндогенного IgG в крови, вполне вероятно, что конкурентное ингибирование FcRn потребует очень больших доз, и, таким образом, имеет те же ограничения, что и у аналогичной текущей терапии с IVIG.

Соответственно, хотя анти-FcRn антитело раскрыто в WO 2006/118772, WO 2007/087289, WO 2009/131702, WO 2012/167039, существует настоятельная необходимость в разработке усовершенствованного антитела человека, которое имеет высокую аффинность к FcRn и, таким образом, может удалить патогенное антитело даже при низких дозах и снизить иммуногенность.

Техническая задача настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения предприняли множество усилий для решения описанной выше проблемы и создания медикамента для эффективного и фундаментального лечения аутоиммунного заболевания, включая ИТР, и, наконец, получили антитело, которое имеет высокую аффинность к FcRn, его фрагменты и предложили способ их получения. Связывающиеся с FcRn антитело или его фрагмент специфически связываются с FcRn-цепью pH-независимым образом и неконкурентным образом препятствуют связыванию Fc антитела с FcRn, что приводит к лечению аутоиммунных заболеваний за счет снижения *in vivo* уровня аутологичных антител, которые могут быть причиной аутоиммунного заболевания.

Задачей настоящего раскрытия является получение фармацевтической композиции, предназначенной для лечения аутоиммунных заболеваний, содержащей антитело, связывающееся с FcRn, где аутоиммунное заболевание представляет собой иммунную нейтропению, синдром Гийена-Барре, эпилепсию, аутоиммунный энцефалит, синдром Исаака, синдром невуса, пузырчатку обыкновенную, эксфолиативную пузырчатку, буллезный пемфигоид, приобретённый буллезный эпидермолиз, пемфигоид беременных, пузырчатку слизистой оболочки, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную анемию, аутоиммунную базедову болезнь, синдром Гудпасчера, тяжелую псевдопаралитическую миастению, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, волчанку, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, волчаночный нефрит или мембранозную нефропатию или что-либо в этом роде.

Техническое решение

Для достижения вышеуказанных целей в настоящем изобретении предлагается выделенное анти-FcRn антитело, содержащее

CDR1, содержащий одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 и 42;

CDR2, содержащий одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 и 43; и

CDR3, содержащий одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 и 44, или их фрагмент.

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенному анти-FcRn антителу или его фрагменту, содержащему

CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 и 42;

CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 и 43; и

CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 и 44.

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенному анти-FcRn антителу, содержащему одну или несколько переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, содержащему одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20.

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенному анти-FcRn антителу, содержащему одну или несколько переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащему аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологии с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, кодирующий анти-FcRn антитело или его фрагмент.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, кодирующий анти-FcRn антитело, содержащее одну или несколько последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, кодирующий анти-FcRn антитело, содержащее последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с еще одним или последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, клетка-хозяин, которая трансфицирована рекомбинантным экспрессирующим вектором. В настоящем изобретении дополнительно предлагается способ получения антитела или его фрагмента, специфически связывающегося с FcRn, включающий культивирование клетки-хозяина и получение антитела из нее и выделение и очистку полученного антитела, для извлечения анти-FcRn антитела.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-FcRn антитело или его фрагмент, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ лечения пациента, страдающего от аутоиммунного заболевания, включающий введение композиции указанному пациенту.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело, помеченное детектируемой меткой.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ обнаружения FcRn in vivo или in vitro, которые включает применение анти-FcRn антитела или его фрагмента.

Полезные эффекты.

Антитело по изобретению или его фрагмент, специфичные к FcRn, который представляет собой рецептор, имеющий высокую аффинность к IgG, обладает высокой аффинностью и специфичностью, вызывает незначительные проблемы или не вызывает совсем проблем, связанных иммуногенностью, и связывается с FcRn неконкурентно с IgG или чем-либо подобным для уменьшения сывороточных уровней аутоантитела. В силу таких свойств антитело или его фрагмент является полезным для лечения и диагностики аутоиммунных заболеваний.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты анализа экспрессии антител в клетках CHO-S и анализа белков антител HL161A, HL161B, HL161C и HL161D, полученных очисткой с помощью протеина А, на SDS-PAGE геле в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях. Было показано, что в невосстанавливающих условиях каждое из антител HL161 обладало полной структурой человеческого типа IgG1 и имело размер около 160 кДа, а в восстанавливающих условиях тяжелая цепь имела размер около 55 кДа, и легкая цепь имела размер около 25 кДа, что свидетельствует о том, что антитело состоит из типичных субъединиц антител. На фиг. 1 дорожка 1 представляет собой маркер молекулярной массы (MW), дорожка 2 представляет собой 2 μ г невосстановленного (*NEW-обработанного) антитела, и дорожка 3 представляет собой 2 μ г восстановленного антитела.

На фиг. 2 приведены результаты анализа, осуществленного с помощью системы SPR с целью определения кинетической диссоциации (KD) четырех видов анти-FcRn антител (HL161A, HL161B, HL161C и HL161D), которые связываются с FcRn. Результаты на фиг. 2 были получены путем анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161A, HL161B, HL161C или HL161D при pH 6,0 и pH 7,4 с использованием чипа Proteon GLC и системы Proteon XPR36 (Bio-Rad).

На фиг. 2a продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161A при pH 6,0.

На фиг. 2b продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161A при pH 7,4.

На фиг. 2c продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и

антителом HL161B при pH 6,0.

На фиг. 2d продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161B при pH 7,4.

На фиг. 2e продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161C при pH 6,0.

На фиг. 2f продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161C при pH 7,4.

На фиг. 2g продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161D при pH 6,0.

На фиг. 2h продемонстрированы результаты анализа взаимодействия между человеческим FcRn и антителом HL161D при pH 7,4.

На фиг. 3 продемонстрирована способность двух выбранных антител связываться с поверхностью клетки, и показаны результаты, полученные при обработке FcRn-сверхэкспрессирующих человеческих клеток HEK293 выбранными антителами HL161A и HL161B, связывающимися с человеческим FcRn, присутствующим на поверхности клеток, и анализ антител, связывающихся с клеточной поверхностью при pH 6,0 и pH 7,4. Связывание каждого из антител HL161A и HL161B с человеческим FcRn выражали в виде значения MFI, полученного клеточным сортером с возбуждением флуоресценции (FACS) с использованием козьего Alexa488-меченого антитела против человеческих антител после обработки клеток каждым антителом при различных значениях pH.

На фиг. 4 приведены результаты анализа способности блокировать связывание человеческого IgG с FcRn-экспрессирующими клетками человека при pH 6,0, и приведены результаты наблюдений, относительно того, могут ли два выбранных антитела, связывающиеся с человеческим FcRn клеточной поверхности, блокировать связывание человеческого IgG с человеческим FcRn на клеточном уровне. Профиль способности блокировать связывание Alexa488-меченого человеческого IgG с человеческим FcRn получали путем разбавления каждого из антител HL161A и HL161B, подтверждением связывания с FcRn-сверхэкспрессирующими человеческими клетками HEK293, серийным 4-кратным разведением с 200 нМ.

На фиг. 5a и фиг. 5b продемонстрированы результаты анализа эффекта антител HL161A и HL161B, полученные у трансгенных мышей Tg32, экспрессирующих человеческий FcRn (hFcRn +/+, hβ2m +/+, mFcRn -/-, mβ2m -/-), на катаболизм hIgG1. В момент времени 0 ч 5 мг/кг биотин-hIgG и 495 мг/кг человеческого IgG вводили внутривенно до насыщения IgG in vivo. Что касается введения лекарственного средства, то в момент времени 24, 48, 72 и 96 ч после введения биотин-IgG, IgG1, HL161A, HL161B или PBS вводили внутривенно в дозах 5, 10 и 20 мг/кг один раз в сутки. Сбор образцов проводили в моменты времени 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч после введения биотина-IgG. В моменты времени 24, 48, 72 и 96 ч собирали кровь перед введением лекарственного средства, а оставшееся количество биотин-IgG анализировали с помощью метода ELISA. Результаты выражали как отношение оставшегося количества в каждый момент времени к 100% для оставшегося количества в образце крови, собранном через 24 ч.

На фиг. 6 продемонстрированы результаты анализа изменения уровня в крови обезьяны IgG, вызываемого введением двух антител (HL161A и HL161B) макакам, имеющим 96% гомологию последовательности с человеческим FcRn. Каждое из антител HL161A и HL161B вводили внутривенно макакам в дозах 5 и 20 мг/кг один раз в сутки, и, как результат, было показано, что обезьяны IgG снизились до 70% по сравнению с ними же в момент времени 0 ч, и снижение составляло примерно 30% вплоть до 29-го дня.

На фиг. 6a показаны эффекты снижения сывороточных IgG для антител HL161A и HL161B при различных концентрациях антител.

На фиг. 6b показаны эффекты снижения сывороточных IgG для антител HL161A и HL161B (концентрация: 5 мг/кг) у индивидуальных обезьян.

На фиг. 6c показаны эффекты снижения сывороточных IgG для антител HL161A и HL161B (концентрация: 20 мг/кг) у индивидуальных обезьян.

На фиг. 7a и 7b продемонстрированы результаты анализа фармакокинетических профилей HL161A и HL161B в эксперименте, проведенном с использованием макак. Было показано, что в целом HL161B имело высокую AUC периода полужизни и C_{max} по сравнению с HL161A.

На фиг. 8a-8c продемонстрированы результаты анализа изменений уровней в крови обезьян IgM, IgA и альбумина, вызванных введением антител HL161A и HL161B в эксперименте, проведенном с использованием макак. Были отмечены небольшие изменения уровней в крови обезьян IgM, IgA и альбумина, и эти изменения были в пределах нормальных диапазонов для макак, что позволяет предположить, что подобные изменения являются результатом различий между отдельными индивидуумами, а не воздействием исследуемых веществ.

На фиг. 8a показано изменение уровня сывороточного IgM обезьян.

На фиг. 8b показано изменение уровня сывороточного IgA обезьян.

На фиг. 8c показано изменение уровня сывороточного альбумина обезьян.

Способ по изобретению.

Для достижения вышеуказанных целей в настоящем изобретении предлагается антитело, которое может специфически связываться с FcRn с высокой аффинностью pH-независимым образом и которое включает последовательность человеческого происхождения и, таким образом, не вызывает практически никакого иммунного ответа при введении *in vivo*.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением являются связывающими молекулами, обладающими специфичностью в отношении FcRn. Антитела могут включать моноклональные антитела (например, полноразмерные антитела, имеющие иммуноглобулиновый Fc-домен), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, биспецифические антитела, димеры и одноцепочечные молекулы, и фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv), без ограничения перечисленным. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой, например, моноклональные антитела к человеческому FcRn.

Моноклональные антитела включают мышинные антитела. Кроме того, моноклональные антитела включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов, таких как мышь, или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, таких как человек, и фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. "Гуманизированные антитела" используются в качестве подмножества "химерных антител".

В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены человеческие антитела. "Человеческие антитела" представляют собой антитела, которые вырабатываются людьми или имеют аминокислотные последовательности, соответствующие антителам, продуцируемым с использованием любой технологии производства человеческих антител. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных технологий, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея. Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было изменено для получения таких антител в ответ на иммунизацию антигеном, но чьи эндогенные локусы были отключены, например, иммунизированным ксеномышам. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть в форме, например, человеческих антител.

Нативные четырехцепочечные антитела представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен на одном конце (V_L) и константный домен на другом своем конце. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельный домен (V_H) на N-конце и имеет три константных домена (CH) для α и γ цепей и четыре CH домена для μ и ε изотипов.

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что некоторые части вариабельных доменов в значительной степени различаются по последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными участками (HVR), т.е. CDR как в вариабельных доменах легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные участки вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Вариабельные домены легкой и тяжелой цепей содержат от N- к C-концу домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

В настоящем описании антитела, имеющие аффинность и специфичность по отношению к человеческому FcRn, были получены с использованием животных, трансгенных по человеческому иммуноглобулину. Трансгенные животные могут быть получены путем инактивации зародышевых генов Ig животного и трансплантации человеческих зародышевых генных локусов Ig. Использование трансгенных животных, имеет преимущество, которое заключается в том, что антитело естественным образом оптимизировано иммунной системой животного, без необходимости созревания аффинности в результате чего антителенное лекарственное средство имеет низкую иммуногенность и высокую аффинность может быть разработано в кратчайшие сроки (US 20090098134, US 20100212035, Menoret et al., Eur. J. Immunol., 40:2932, 2010).

В настоящем описании использовали OmniRat™ (OMT, США), у которых имеется запатентованная технология на крыс, трансгенных по иммуноглобулинам человека. OmniRat™ может эффективно выбирать антитело, имеющее высокую аффинность к человеческому FcRn, так как оно имеет тяжелую цепь, состоящую из доменов CH2 и CH3, которые происходят из генов крысы, и V, D и J области и домен CH1, которые происходят из человеческих генов, и легкую цепь κ и λ из человека, для эффективного отбора антител, которые имеют высокую аффинность к человеческому FcRn (Menoret et al., Eur. J. Immunol., 40:2932, 2010).

Для того чтобы получить моноклональные антитела, имеющие высокую аффинность к FcRn, трансгенных крыс (OmniRat™) иммунизировали инъекцией человеческого FcRn, а затем В-клетки извлекали из их клеток и сливали с клетками миеломы для создания гибридомы, после чего полученные антитела очищали из полученной гибридомы.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением действует в качестве неконкурентного ингиби-

тора IgG за связывание с FcRn. Связывание антитела настоящего изобретения с FcRn приводит к ингибированию связывания патогенных антител с FcRn, что способствует клиренсу (т.е. удалению) патогенных антител из организма объекта путем уменьшения периода полужизни патогенных антител.

Используемый в данном описании термин "патогенное антитело" означает антитело, которое вызывает патологические состояния или заболевания. Примеры таких антител включают, без ограничения перечисленным, антитромбоцитарные антитела, антиацетилхолиновые антитела, антитела против нуклеиновых кислот, антифосфолипидные антитела, антиколлагеновые антитела, антиангиотензиновые антитела, антидесмоглеиновые антитела и т.п.

Антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением имеет преимущество, которое заключается в том, что антитело позволяет неконкурентно ингибировать связывание патогенных антител с FcRn при физиологическом pH (т.е. pH 7,0-7,4). FcRn связывается с его лигандом (т.е. IgG) и, по существу, не демонстрирует аффинность к IgG при физиологическом значении pH, а не кислом pH. Таким образом, анти-FcRn антитело, которое специфически связывается с FcRn при физиологическом значении pH, действует как неконкурентный ингибитор связывания IgG с FcRn, и в данном случае связывание анти-FcRn антитела с FcRn никак не затрагивается присутствием IgG. Таким образом, согласно изобретению антитело, которое связывается с FcRn неконкурентно с IgG pH-независимым образом, имеет преимущество по сравнению с традиционными конкурентными ингибиторами (т.е. антителами, которые связываются с FcRn конкурентно с IgG) в том, что это антитело может лечить заболевания даже при значительно более низких концентрациях путем FcRn-опосредованной сигнализации IgG. Кроме того, в процедуре внутриклеточной миграции в состоянии, связанном с FcRn, анти-FcRn антитела в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают его связывание с FcRn с аффинностью выше, чем IgG в крови, и, таким образом, могут ингибировать связывание IgG с FcRn даже в эндосомах, которые имеют среду с кислым pH, при котором IgG могут связываться с FcRn, способствуя тем самым клиренсу IgG.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением имеет аффинность к FcRn даже в среде с физиологическим pH (т.е. при pH 7,0-7,4), в которой IgG не связывается с FcRn. При pH 6,0 антитело по настоящему изобретению имеет более высокую аффинность к FcRn по сравнению с сывороточным IgG, что указывает на то, что оно действует в качестве неконкурентного ингибитора.

В одном из воплощений настоящего изобретения настоящее изобретение относится к антителу, которое специфически связывается с FcRn или его фрагментом, содержащим

CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 и 42;

CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 и 43; и

CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 и 44.

Специалистам в данной области будет понятно, что удаление, добавление или замена некоторых аминокислот в аминокислотных последовательностях, указанных в приведенных выше SEQ ID NO, также подпадает под объем притязаний настоящего изобретения.

Кроме того, последовательности, имеющие гомологию с нуклеотидными последовательностями и аминокислотными последовательностями, описанными в настоящем описании, в пределах определенного диапазона, также попадают в объем притязаний настоящего изобретения. "Гомология" относится к сходству по меньшей мере с одной нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-44, и включает гомологию по меньшей мере 90%. Предпочтительно гомология может составлять по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. Сравнение гомологии выполняется визуально или с использованием известной программы сравнения, например, такой как алгоритм BLAST со стандартными параметрами. Доступная на коммерческой основе программа может выражать степень гомологии между двумя или несколькими последовательностями в процентах. Процент (%) гомологии можно рассчитать для смежных последовательностей.

Кроме того, антитела, которые специфически связываются с FcRn, имеющие KD (константу диссоциации) 0,01-2 нМ при pH 6,0 и pH 7,4, также входят в объем притязаний настоящего изобретения. "KD", используемый в данном описании, относится к константе равновесной диссоциации связывания антитело-антиген и может быть вычислен с помощью следующего уравнения: $KD = kd/ka$, где ka обозначает константу скорости ассоциации, а kd - константу скорости диссоциации. Измерение kd или ka может быть выполнено при температуре 25°C или 37°C.

В одном примере антитело по настоящему изобретению включает: CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23,

NO: 2, 4, 6, 8, или 10, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18 или 20.

Более подробно, антитело или его антиген-связывающий фрагмент по настоящему изобретению включает одну или несколько вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

"Фрагмент" или "фрагмент антитела" в качестве терминов используются в настоящем описании в отношении антитела для обозначения полипептида, полученного из полипептидной молекулы антитела (например, полипептида тяжелой или легкой цепи антитела), который не включает полноразмерный полипептид антитела, но который по-прежнему включает по меньшей мере часть полноразмерного полипептида антитела. Фрагменты антител часто включают полипептиды, которые содержат расщепленную часть полноразмерного полипептида антитела, хотя этот термин не ограничивается такими расщепленными фрагментами. Так как фрагмент, как этот термин используется в настоящем описании в виде ссылки на антитело, включает фрагменты, которые содержат одиночные полипептидные цепи, полученные из полипептидов антитела (например, тяжелой или легкой цепи полипептидов антитела), то следует понимать, что фрагмент антитела может, сам по себе, не связываться с антигеном.

Фрагменты антитела по настоящему изобретению включают, без ограничения перечисленным, одноцепочечные антитела, биспецифические, триспецифические и мультиспецифические антитела, такие как димеры, триатела и тетраатела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd, ScFv, доменные антитела, антитела с двойной специфичностью, минитела, SCAP (белок, регулирующий расщепление белка стероидного регуляторного элемента/sterol regulatory binding protein cleavage activating protein), хелатирующие рекомбинантные антитела, тритела или битела, интратела, иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP), слитые белки связывающего домена иммуноглобулина, камелизированные антитела, VHH-содержащие антитела, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела, IgG4-антитела, производные константных областей антител и синтетические антитела, основанные на белковых каркасах, которые обладают способностью связываться с FcRn. Специалистам в данной области будет очевидно, что любой фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением будет демонстрировать те же самые свойства, что и антитело согласно настоящему изобретению.

Кроме того, антитела, имеющие мутацию в вариабельной области, включены в объем настоящего изобретения. Примеры таких антител включают антитела, имеющие консервативную замену аминокислотного остатка в вариабельной области. Используемый в данном описании термин "консервативная замена" относится к замещению другим аминокислотным остатком, имеющим свойства, аналогичные свойствам исходного аминокислотного остатка. Например, лизин, аргинин и гистидин обладают сходными свойствами, поскольку они имеют основную боковую цепь, а аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота обладают сходными свойствами, поскольку они имеют кислотную боковую цепь. Кроме того, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан обладают сходными свойствами, поскольку они имеют незаряженную полярную боковую цепь, а аланин, валин, лейцин, треонин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин обладают сходными свойствами в том, что они имеют неполярную боковую цепь. Кроме того, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин обладают сходными свойствами, поскольку они имеют ароматическую боковую цепь. Таким образом, специалистам в данной области будет очевидно, что даже когда имеет место замещение аминокислотных остатков в группах, демонстрирующих сходные свойства, как описано выше; то это никак особо не изменит свойства. Соответственно, антитела, имеющие мутацию, вызванную консервативной заменой в вариабельной области, включены в объем притязаний настоящего изобретения.

Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению или его фрагмент может быть использовано в виде конъюгата с другим веществом. Вещества, которые могут быть использованы в качестве конъюгатов с антителом по настоящему изобретению или его фрагментом, включают терапевтические аген-

ты, которые обычно используются для лечения аутоиммунных заболеваний, вещества, способные ингибировать активность FcRn, и группу, которая физически связана с антителом для улучшения его стабильности и/или удержания в кровотоке, например в крови, сыворотке, лимфе или других тканях. Например, FcRn-связывающий антитело может быть связано с полимером, например неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры будут существенно отличаться по массе. Могут быть использованы полимеры, имеющие средние значения молекулярные массы в интервале от около 200 до около 35000 (или около 1000 до около 15000, и 2000 до около 12500). Например, FcRn-связывающее антитело может быть конъюгировано с водорастворимыми полимерами, например гидрофильными поливиниловыми полимерами, например, поливиниловым спиртом и поливинилпирролидоном. Не ограничивающий перечень таких полимеров включает, без ограничения перечисленным, гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиоксиэтилированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что растворимость в воде блок-сополимеров сохраняется.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения аутоиммунного заболевания, содержащей анти-FcRn антитело и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания, содержащему введение эффективного количества антитела, специфически связывающегося с FcRn, пациенту, нуждающемуся в этом.

Фармацевтическая композиция может включать фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель и т.п., которые хорошо известны в данной области. Фармацевтически приемлемые носители должны быть совместимы с активным ингредиентом, таким как антитело или его фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением и могут представлять собой физиологический раствор, стерильную воду, раствор Рингера, забуференный физиологический раствор, раствор декстрозы, раствор мальтодекстрина, глицерин, этанол или смесь двух или нескольких из них. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может, при необходимости, включать другие обычные добавки, в том числе антиоксиданты, буферы и бактериостатические агенты. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде инъеклируемых форм, таких как водные растворы, суспензии или эмульсии с помощью разбавителей, диспергаторов, поверхностно-активных веществ, связующих веществ и смазывающих веществ. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть получена путем приготовления состава в различной форме, например в виде порошка, таблетки, капсулы, жидкости, инъекции, мази, сиропа и т.д., в контейнере с одной дозой или с множеством доз, таким как запаянная ампула или флакон.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть применена ко всем аутоиммунным заболеваниям, которые опосредуются IgG и FcRn, и типичные примеры таких аутоиммунных заболеваний включают, без ограничения перечисленным, иммунную нейтропению, синдром Гийена-Барре, эпилепсию, аутоиммунный энцефалит, синдром Исаака, синдром невуза, пузырчатку обыкновенную, эксфолиативную пузырчатку, буллезного пемфигоида, приобретённого буллезного эпидермолиза, пемфигоида беременных, пузырчатку слизистой оболочки, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунную анемию, аутоиммунную базедову болезнь, синдром Гудпасчера, миастению, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, волчанку, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, волчаночный нефрит и мембранозную нефропатию.

В способе обработки в соответствии с настоящим изобретением доза антитела может подходящим образом определяться с учетом степени тяжести заболевания пациента, состояния, возраста, истории болезни и т.п. Например, антитело можно вводить в дозе от 1 мг/кг до 2 г/кг. Антитело можно вводить один или несколько раз.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ облегчения аутоиммунного или аллоиммунного состояния, включающий введение антитела по настоящему изобретению или фрагмента антитела объекту, нуждающемуся в таком лечении. Настоящее изобретение также предусматривает специфическую анти-FcRn терапию.

Способ улучшения состояния при аутоиммунном или аллоиммунном состоянии или оригинальная анти-FcRn терапия могут быть осуществлены путем введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена перорально или парентерально. Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть введена различными способами, в том числе, без ограничения перечисленным, пероральным, внутривенным, внутримышечным, внутриартериальным, интрамедуллярным, интродуральным, внутрисердечным, трансдермальным, подкожным, внутрибрюшинным, желудочно-кишечным, сублингвальным и местным путями. Доза композиции по настоящему изобретению может изменяться в зависимости от различных факторов, таких как масса пациента тела, возраст, пол, состояние здоровья и диеты, времени и способа введения, скорости экскреции и тяжести заболевания, и может быть легко определена с помощью обычного специалиста в данной области. Как правило, 1-200 мг/кг и предпочтительно 1-40 мг/кг композиции можно вводить пациентам, пораженным аутоиммунными или аллоиммунными состояниями, и эти схемы лечения предпочтительно предназначены для снижения концентрации

сывороточного эндогенного IgG до менее чем 75% от значений до обработки. С учетом состояний пациентов могут быть применены прерывистые и/или постоянные (непрерывные) стратегии дозирования.

В другом воплощении настоящее изобретение также относится к диагностической композиции, содержащей антитело по настоящему изобретению или его фрагмент, и диагностический способ, который использует диагностическую композицию. Другими словами, антитело по настоящему изобретению или его фрагмент, который связывается с FcRn, имеет *in vitro* и *in vivo* диагностическую применимость.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к композиции для обнаружения FcRn, содержащей анти-FcRn антитело или его фрагмент. Настоящее изобретение также предоставляет способ, систему или устройство для обнаружения FcRn *in vivo* или *in vitro*, включающие обработку анти-FcRn антителом.

In vitro способ, система или устройство детекции могут, например, включать (1) приведение образца в контакт с FcRn-связывающим антителом; (2) детекцию образования комплекса между FcRn-связывающим антителом и образцом; и/или (3) приведение эталонного образца (например, контрольный образец) в контакт с антителом; и (4) определение степени образования комплекса между антителом и образцом по сравнению с таковым в эталонном образце. Изменение (например, статистически значимое изменение) при образовании комплекса в образце или объекте по сравнению с таковым в эталонном образце или объекте указывает на наличие FcRn в образце.

In vivo способ, система или устройство детекции могут включать: (1) введение FcRn-связывающего антитела объекту; и (2) детекцию образования комплекса между FcRn-связывающим антителом у объекта. Детекция может включать определение местоположения или времени формирования комплекса. FcRn-связывающее антитело может быть непосредственно или косвенно помечено детектируемым веществом для облегчения обнаружения связанного или несвязанного антитела. Подходящие обнаруживаемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Формирование комплекса между FcRn-связывающим антителом и FcRn могут быть обнаружены путем измерения или визуализации связанного антитела связанного или не связанного с FcRn. Может быть использован обычный анализ детекции, например твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) или иммуногистохимия. В дополнение к маркировке FcRn-связывающего антитела, присутствие FcRn может быть проанализировано в образце с помощью конкурентного анализа с использованием стандарта, меченного детектируемым веществом и немеченного FcRn-связывающего антитела. В одном из примеров данного анализа, биологический образец, меченый стандарт и FcRn-связывающий антитела объединяют и определяют количество меченого стандарта, не связанного с FcRn. Количество FcRn в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандартного не связанного с FcRn.

Для целей обнаружения антитело по настоящему изобретению или его фрагмент может быть помечено флуорофором и хромофором. Поскольку антитела и другие белки поглощают свет с длинами волн вплоть до около 310 нм, флуоресцентные фрагменты должны быть выбраны так, чтобы иметь существенное поглощение при длинах волн выше 310 нм и предпочтительно выше 400 нм. Антитело по настоящему изобретению или его фрагмент могут быть помечены различными подходящими люминофорами и хромофорами. Одна из групп люминофоров представляет собой ксантеновые красители, которые включают флуоресцеины и родамины. Другая группа флуоресцентных соединений представляет собой нафтиламины. После мечения флуорофором или хромофором антитело может быть использовано для обнаружения наличия или локализации FcRn в образце, например, с помощью флуоресцентной микроскопии (например, конфокальной или деконволюционной микроскопии).

Обнаружение наличия или локализации FcRn с использованием антитела по настоящему изобретению или его фрагмента может быть осуществлено различными способами, такими как гистологический анализ, белковые эрреи и FACS (флуоресцентная сортировка клеток).

В настоящем описании присутствие FcRn или FcRn-экспрессирующей ткани *in vivo* может быть определено с помощью способа визуализации *in vivo*. Способ включает (I) введение объекту (например, пациенту, имеющему аутоиммунное расстройство) анти-FcRn антитела, конъюгированного с детектируемым маркером; и (II) воздействие на объект средства для обнаружения указанного детектируемого маркера в FcRn-экспрессирующих тканях или клетках. Например, объект визуализируется, например, с помощью ЯМР или других томографических средств. Примеры меток, используемых для диагностической визуализации, включают радиоактивные флуоресцентные метки, позитрон-излучающие изотопы, хемилюминисцентные вещества и ферментативные маркеры. Радиоизотопное антитело может быть использовано для *in vitro* диагностических тестов. Удельная активность изотопно-меченого антитела зависит от периода полураспада, изотопной чистоты радиоактивной метки, и того, как метка включена в антитело.

Настоящее изобретение также обеспечивает набор, содержащий антитело, которое связывается с FcRn, его фрагмент и инструкции для диагностики, например, использования FcRn-связывающего антитела или его фрагмента для того, чтобы обнаружить FcRn, *in vitro*, например, в образце, например, биопсии или клетке из пациента, имеющего аутоиммунное расстройство, или *in vivo*, например, путем визуализации субъекта. Комплект может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный

реагент, такой как метка или дополнительный диагностический агент. Для использования *in vivo* антитело может быть приготовлено в виде фармацевтической композиции.

В другом воплощении настоящее изобретение направлено на полинуклеотидные последовательности, которые кодируют антитела по настоящему изобретению или его фрагмент.

В качестве примера полинуклеотидная последовательность, которая кодирует антитело по настоящему изобретению или его фрагмент, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% гомологию с одной или несколькими последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19, или последовательность, имеющую гомологию более чем на 90% по сравнению с последовательностями, упомянутыми выше.

В частности, полинуклеотидная последовательность антитела по настоящему изобретению или его фрагмент представляет собой последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9, и/или последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела по настоящему изобретению с SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17 или 19.

В другом воплощении настоящее изобретение направлено на рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, на клетку-хозяин, которая трансфицирована рекомбинантным вектором экспрессии, и на способ получения антитела, специфически связывающегося с FcRn, или его фрагмента, с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора и клетки-хозяина.

В одном воплощении изобретения антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно получают путем экспрессии и очистки способом генной рекомбинации. В частности, вариабельные области, которые кодируют оригинальное антитело, которое специфически связывается с FcRn, продуцируются экспрессией в отдельных клетках-хозяевах или одновременно в одной клетке-хозяине.

Используемый в данном описании термин "рекомбинантный вектор" относится к экспрессирующим векторам, способным экспрессировать представляющий интерес белок в подходящей клетке-хозяине и означает конструкцию ДНК, которая включает основные регуляторные элементы, функционально связанные для экспрессии нуклеотидной вставки. Используемый в данном описании термин "функционально связанный" означает, что последовательность контроля экспрессии нуклеиновой кислоты функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок, для выполнения общих функций. Функциональная связь с рекомбинантным вектором может быть выполнена с использованием технологии рекомбинации генов, хорошо известной в данной области, а сайт-специфическое расщепление ДНК и лигирование могут быть легко выполнены с использованием ферментов, как правило, известных в данной области.

Подходящий экспрессирующий вектор, который может быть использован в настоящем изобретении, может включать элементы регуляции экспрессии, такие как промотор, оператор, иницирующий кодон, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования и энхансер, и сигнальная последовательность для нацеливания в мембрану или для секреции. Иницирующий и стоп-кодоны, как правило, рассматриваются как часть нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуногенный белок-мишень, и необходимы для функциональности в индивидууме, которому вводится генетическая конструкция, и должны быть в рамке с кодирующей последовательностью. Промоторы, как правило, могут быть конститутивными или индуцибельными. Прокариотические промоторы включают, без ограничения перечисленным, *lac*, *tac*, T3 и T7 промоторы. Эукариотические промоторы включают, без ограничения перечисленным, промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор, такой как длинный концевой повтор (LTR) HIV, промотор вируса Молони, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса Эпштейна-Барр (EBV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), а также промоторы из генов человека, таких как человеческий β -актин, гемоглобин человека, креатин человека мышц и человеческий металлотионеин. Экспрессирующий вектор может содержать селективный маркер, который позволяет осуществлять селекцию клеток-хозяев, содержащих вектор. Гены, кодирующие продукты, которые придают селективные фенотипы, такие как устойчивость к лекарственным средствам, потребность в питательных веществах, устойчивость к цитотоксическим агентам или экспрессии поверхностных белков, используются в качестве общих селективных маркеров. Из-за того что только клетки, экспрессирующие селективный маркер, выживают в среде, обработанной с помощью селективного агента, могут быть отобраны трансформированные клетки. Кроме того, реплицирующийся экспрессирующий вектор может содержать начало репликации, специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая иницирует репликацию. Рекомбинантные экспрессирующие векторы, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают различные векторы, такие как плазмиды, вирусы и космиды. Вид рекомбинантного вектора специально не ограничен, и рекомбинантный вектор может функционировать для экспрессии нужного гена и получения желаемого белка в различных клетках-хозяевах, таких как прокариотические и эукариотические клетки. Тем не менее, предпочтительно использовать вектор, который может производить большое количество чужеродного белка, сходного с природным белком, имея при этом сильную способность экспрессии с промотора, демонстрируя сильную активность.

В настоящем описании различные экспрессирующие комбинации хозяин/вектор могут быть ис-

пользованы для экспрессии антитела или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением. Например, экспрессирующие векторы, подходящие для эукариотических хозяев, включают, без ограничения перечисленным, SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовирус, аденоассоциированный вирус, цитомегаловирус и ретровирус. Экспрессирующие векторы, которые могут быть использованы для бактериальных хозяев, включают бактериальные плазмиды, такие как pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, PUC, Col E1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, плазмиды, такие как RP4, имеющий более широкий диапазон хозяев, фаговая ДНК представлена в виде различных производных фага лямбда, таких как GT10, g11 и NM989, и другие фаги ДНК, такие как M13 и нитчатые одноцепочечной ДНК фага. Векторы экспрессии, полезные в дрожжевых клетках, включают плазмиды 2 μ m и их производные. Полезным в клетках насекомых вектором является pVL941.

Рекомбинантный вектор вводят в клетку-хозяин для образования трансформанта. Клетки-хозяева, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают прокариотические клетки, такие как *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus* sp., грибы, такие как *Aspergillus* sp., дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp. и *Neurospora crassa*, и эукариотические клетки, такие как клетки низших эукариот, и другие клетки высших эукариот, такие как клетки насекомых.

Клетки-хозяева, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, предпочтительно, получают из растений и млекопитающих, и их примеры включают, без ограничения перечисленным, клетки почек обезьян (COS-7), клетки NSO, SP2/0, клетки яичников китайского хомяка (CHO), W138, клетки почки детеныша хомяка (BHK), MDCK, клетки миеломы, клетки Hut 78 и клетки HEK293. Предпочтительно используют клетки CHO.

В настоящем описании трансфекция или трансформация клетки-хозяина включает любой способ, с помощью которого нуклеиновые кислоты могут быть введены в организм, клетку, ткань или орган, и, как известно в данной области, могут быть выполнены с использованием подходящей стандартной методики, выбранной в соответствии с видом клетки-хозяина. Эти способы включают, без ограничения перечисленным, электропорацию, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция (CaPO₄), осаждение хлоридом кальция (CaCl₂), перемешивание с волокнами карбида кремния и трансформацию, опосредованную агробактериями, ПЕГ, декстран сульфатом, липофектамино и высушиванием/ингибированием.

FcRn-специфическое антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением может быть получен в больших количествах путем культивирования трансформанта, содержащего рекомбинантный вектор в питательной среде, а среда и условия культивирования, которые используются в настоящем изобретении, могут быть подходящим образом выбраны в зависимости от вида клетки-хозяина. Во время культивирования условия, в том числе температура, pH среды и время культивирования, можно контролировать таким образом, чтобы они были пригодны для роста клеток и массовой выработки белка. Антитело или фрагмент антитела, полученные описанным способом рекомбинации, могут быть собраны из среды или лизата клеток и могут быть выделены и очищены с помощью традиционных биохимических методов выделения (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990)). Эти методы включают, без ограничения перечисленным, электрофорез, центрифугирование, гель-фильтрацию, осаждение, диализ, хроматографию (ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, иммуноферментную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и т.д.), изoeлектрическое фокусирование и возможны их различные модификации и комбинации. Предпочтительно, если антитело или фрагмент антитела выделяют и очищают с использованием протеина А.

Антитела согласно настоящему изобретению продемонстрировали антигенсвязывающую способность (значения KD) от около 300 пМ или менее до около 2 нМ или менее при pH 7,4 и продемонстрировали значения KD от 2 нМ или менее до 900 пМ или менее при pH 6,0. Антитела по настоящему изобретению обладают сильной аффинностью связывания с hFcRn 0,01-2 нМ, и, таким образом, считается, что антитела, связываясь с внешней стороной клеток, сохраняют свое связывание до эндосом, что позволяет предположить, что эти антитела обладают прекрасным эффектом блокирования связывания аутоантител с hFcRn. Кроме того, этот эффект блокирования связывания аутоантител с hFcRn также был подтвержден в анализе блокирования, осуществленном с помощью клеток, экспрессирующих FcRn человека, и FACS.

Примеры

В дальнейшем настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Специалисту в этой области будет очевидно, что эти примеры представлены только в иллюстративных целях и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Конструирование анти-FcRn-экспрессирующей библиотеки с использованием трансгенных крыс.

Иммунизацию проводили с использованием в общей сложности шести трансгенных крыс (OmniRat®, OMT). В качестве иммуногена использовали человеческий FcRn. Обе подушечки лап у крыс иммунизировали восемь раз 0,0075 мг человеческого FcRn (каждый раз) вместе с адьювантом с 3-дневными

интервалами в течение 24 дней. На 28-й день крыс иммунизировали 5-10 мкг иммуногена, разбавленного в буфере PBS. На 28-й день у крыс собирали сыворотку и использовали для определения титра антител. На 31-й день крыс забивали и подколенные лимфатические узлы и паховые лимфатические узлы извлекали для слияния с клетками миеломы P3X63/Ag8.653.

Анализ ELISA проводили для определения титра антител в сыворотке у крыс. В частности, человеческий FcRn разводили в PBS (pH 6,0 или pH 7,4) буфере для того, чтобы сделать 2 мкг/мл раствор и 100 мкл раствора наносили в каждую лунку 96-луночного планшета, а затем инкубировали при 4°C в течение не менее 18 ч. Каждую лунку промывали три раза 300 мкл промывочного буфера (0,05% Tween 20 в PBS) для удаления несвязанного человеческого FcRn, а затем 200 мкл блокирующего буфера добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Тестовый образец сыворотки разводили в 1/100, а затем раствор серийно разбавляли 2 раза для того, чтобы сделать в общей сложности 10 тестируемых образцов, имеющих коэффициент разбавления от 1/100 до 1/256000. После блокирования каждую лунку промывали 300 мкл буфера для промывки, а затем каждый испытуемый образец добавляли в каждую ячейку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. После трехкратной промывки добавляли в каждую лунку 100 мкл 1:50000 разбавления вторичного детектирующего антитела в буфере PBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. После трехкратной промывки снова добавляли в каждую лунку 100 мкл раствора ТМВ и давали реагировать при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем добавляли в каждую лунку 50 мкл стоп-раствора, содержащего 1М серную кислоту для того, чтобы остановить реакцию, после чего измеряли значение OD при 450 нм с помощью ридера микропланшетов. Что касается титра анти-IgG hFcRn в результате иммунизации, то он был выше, чем в преиммунной сыворотке у неиммунизированных крыс со значением OD при длине волны 450 нм в условиях 1/100 разбавления 1.0 или выше, что свидетельствует о том, что крысы были хорошо иммунизированы.

В общей сложности были получены три гибридные библиотеки А, В и С, слитые с помощью полиэтиленгликоля. В частности, трансгенные крысы 1 и 5 были использованы для изготовления библиотеки гибридом А, крысы 2 и 6 были использованы для изготовления библиотеки гибридом В, и крысы 3 и 4 были использованы для изготовления библиотеки гибридом С. Смесь слияния гибридомной библиотеки для построения каждой гибридомной библиотеки культивировали в НАТ-содержащей среде, в течение 7 дней, так что отбирались только клетки, слитые с НАТ. Клетки гибридомы, жизнеспособные в среде НАТ, собирали и культивировали в средах НТ в течение около 6 дней, а затем собирали надосадочную жидкость и измеряли количество IgG крысы в надосадочной жидкости с использованием крысиного набора "Rat IgG ELISA kit" (RD-Biotech). В частности, каждый образец разводили в соотношении 1: 100 и 100 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку планшета для ELISA и смешивали с конъюгированным с пероксидазой IgG против крысиных антител, с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 15 мин. 100 мкл раствора ТМВ добавляли в каждую лунку и давали реагировать при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем 50 мкл стоп-раствора, содержащего 1М серную кислоту, добавляли в каждую лунку для остановки реакции. Далее значение оптической плотности при 450 нм измеряли с помощью ридера для микропланшетов.

Пример 2. Оценка аффинности связывания антигена и способности блокирования связывания IgG анти-hFcRn антителами из гибридных библиотек.

Для анализа связывания антител с человеческим FcRn проводили тот же анализ ELISA (pH 6,0 и pH 7,4), что и указанных выше. Результаты оценки связывания hFcRn тремя гибридными библиотеками А, В и С указывают на то, что аффинность связывания с hFcRn была выше в ряду А>С>В при обоих значениях pH 6,0 и pH 7,4.

Используя культуральные надосадочные жидкости трех библиотек гибридом, оценку аффинности связывания с hFcRn с помощью FACS при 5 нг/мл и 25 нг/мл проводили при pH 6,0 и pH 7,4. Стабильно экспрессирующие FcRn человека HEK293 открепляли от матраса и затем суспендировали в реакционном буфере (0,05% BSA в PBS, pH 6,0 или pH 7,4). Суспензию разбавляли до плотности клеток 2×10^6 клеток/мл и 50 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Затем добавляли 50 мкл надосадочной жидкости культуры библиотеки гибридом, разведенной до 10 нг/мл и 50 нг/мл, добавляли в каждую лунку и суспендировали для связывания антител. Кроличье антитело против козьих IgG с A488 разводили в соотношении 1:200 в реакционном буфере и 100 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку и смешивали с клеточными осадками для проведения реакции связывания, а затем 150 мкл реакционного буфера добавляли в каждую лунку. Измерение проводили с помощью FACS (BD). Как и в случае результатов ELISA, было видно, что гибридная библиотека А показывает самую высокую аффинность связывания.

Оценку способности гибридомной библиотеки блокировать человеческий FcRn с помощью FACS проводили при pH 6,0. В частности, наивные клетки HEK293 и гиперэкспрессирующие FcRn человека клетки HEK293 суспендировали в реакционном буфере (0,05% BSA in PBS, pH 6,0). 1×10^5 клеток добавляли в 96-луночный планшет и обрабатывали 4 нМ надосадочными жидкостями каждой из гибридных библиотек и 0,4 нМ 10-кратным разведением надосадочной жидкости. Для того чтобы подтвердить спо-

способность блокировать hIgG, 100 нМ A488-hIgG1 добавляли в каждую лунку, а затем инкубировали на льду в течение 90 мин. После завершения реакции клеточные осадки промывали 100 мкл реакционного буфера и переносили в круглодонные пробирки с U-образным дном, с последующим измерением в FACS. Измеряли количество 100 нМ A488-hIgG1, остающийся в стабильных клетках, сверхэкспрессирующих FcRn человека, а затем подсчитывали процент блокировки. В качестве контроля изотипа использовали hIgG1, а в качестве положительного контроля использовали разработанные ранее антитела HL161-1Ag для сравнения оценки эффекта блокировки клеток. Каждый контроль анализировали при концентрациях 1 мкМ и 2 мкМ и образец гибридной библиотеки измеряли при двух концентрациях 0,4 нМ и 4 нМ. В результате было обнаружено, что гибридная библиотека А показывает самый высокий блокирующий эффект.

Пример 3. Выделение гибридного клона с помощью FACS и отбор человеческих антител.

С помощью гибридной библиотеки А, демонстрирующей наибольшую аффинности связывания и эффект блокирования человеческого FcR, с помощью FACS (проточной цитометрии) выделяли клоны с получением в общей сложности 442 одиночных клонов. Выделенные моноклональные антитела культивировали в НТ средах, а надосадочную жидкость собирали. Антитело-экспрессирующие гибридные клоны, связывающиеся с hFcRn в надосадочной жидкости, отбирали с помощью FACS. В результате можно было наблюдать, что 100 клонов (M1-M100) прочно связываются с hFcRn-экспрессирующими клетками НЕК293.

РНК выделяли из 100 моноклонов, выбранных с помощью анализа FACS, и выделенную РНК секвенировали. При секвенировании первой стадии 88 из 100 моноклонов были секвенированы и разделены в соответствии с аминокислотной последовательностью в общей сложности на 35 групп (G1-G38). Культуральные надосадочные жидкости репрезентативных клонов 33 групп, за исключением двух клонов (G33 и G35), чьи среды не были доступны, разводили до концентрации 100 нг/мл и аффинность связывания с hFcRn оценивали с помощью ELISA.

Таким же образом, как описано выше, осуществляли оценку сродства связывания hFcRn с помощью FACS при pH 6,0 и 7,4. Порядок аффинности связывания клонов был сходным между pH, а интенсивность связывания проявлялась при различных уровнях.

Кроме того, оценку блокирующих эффектов hFcRn из 33 клонов проводили с помощью FACS при pH 6,0. Рассчитывали (%) блокирования на основании измеренного значения MFI. На основании результатов анализа % блокирования при концентрации 1667 нМ клоны разделили в общей сложности на следующие четыре группы: группа А: 70-100%; группа В: 30-70%; группа С: 10-30% и группа D: 10% или менее.

Для анализа кинетики гибридных клонов SPR человеческий FcRn иммобилизовали, а затем проводили анализ с использованием гибридной культуры в качестве аналита. Большинство клонов за исключением нескольких клонов показало K_{on} 10^6 М или выше и K_{off} 10^{-3} М или ниже. В заключение, было показано, что все клоны имели значение KD от 10^{-9} до 10^{-11} М.

Среди пяти гибридных клонов гены 18 клонов, не имеющих N-гликозилирования или свободного цистеина в последовательности CDR групп А и В, разделенных по результатам анализа блокирующего эффекта hFcRn, были преобразованы в целые последовательности IgG человека.

В частности, сходство аминокислотных последовательностей между VH и VL 18 отобранных антител и групп антител зародышевой линии человека исследовали с использованием Ig BLAST программы на веб-странице NCBI.

Для того чтобы клонировать 18 генов антител человека, сайты узнавания ферментов рестрикции вставляли в оба конца генов следующим образом. EcoRI/ApaI вставляли в вариательный домен тяжелой цепи (VH); EcoRI/XhoI вставляли в вариательный домен легкой цепи лямбда (VL (λ)); EcoRI/NheI сайты узнавания ферментов рестрикции вставляли в вариательный домен легкой цепи каппа (VL (κ)). В случае вариательного домена легкой цепи, последовательность гена вариательной области легкой цепи лямбда (VL (λ)) была связана с геном константной области человеческой постоянной легкой цепи (LC (λ)) в процессе клонирования гена, а последовательность вариательной области легкой цепи каппа (VL (κ)) была связана с геном константной области человеческой легкой цепи (LC (κ)).

При клонировании в экспрессирующие векторы pCHO1.0 для экспрессии антител в клетках животных гены легкой цепи и тяжелой цепи вставляли после расщепления с помощью ферментов рестрикции EcoRV, PacI, AvrII и BstZ17I. Для того чтобы исследовать, совпадают ли экспрессирующие векторы pCHO1.0 18 выбранных генов антитела человека с последовательностями синтезированных генов, проводили секвенирование ДНК.

С помощью экспрессирующих векторов pCHO1.0, которые представляют собой системы экспрессии в животных клетках и содержат все гены легкой цепи и тяжелой цепи антитела, экспрессировали полный человеческий IgG. Человеческое антитело получали путем временной трансфекции плазмидной ДНК каждого из антител в клетки CHO-S и очистки антител, секретируемых в культуральную среду, с помощью колонки с протеином А.

Человеческий IgG инъецировали в hFcRn-экспрессирующих Tg32 (hFcRn +/+, h β 2m +/+, mFcRn -/-,

mβ2m -/-) мышей (Jackson Laboratory), и затем 18 человеческих антител, преобразованных в последовательности IgG человека, вводили в мышей для того, чтобы исследовать, будут ли эти антитела влиять на катаболизм человеческого IgG.

Основываясь на результатах *in vitro* анализа аффинности связывания (KD) для антигена и анализе аффинности связывания человеческого FcRn и блокирующего эффекта с помощью FACS и *in vivo* анализа катаболизма человеческого IgG, отбирали четыре белка человеческого анти-FcRn антитела (HL161A, HL161B, HL161C и HL161D), как наиболее эффективно действующие (фиг. 1). Кроме того, антитело HL161BK, не имеющее N-гликозилирования, получали при замещении аспарагина (N) в положении 83 переменного каркаса тяжелой цепи антитела HL161B на лизин (K). Нуклеотидные последовательности, аминокислотные последовательности и последовательности CDR переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи каждого антитела представлены в табл. 1, 2 и 3.

Таблица 1

Полинуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител FcRn человека

Название антитела	последовательность переменного домена тяжелой цепи		последовательность переменного домена легкой цепи	
	SEQ ID NO.	полинуклеотидной последовательности	SEQ ID NO.	полинуклеотидной последовательности
HL161A	1	GAAGTGCAGC TGCTGGAATC CGGCGGAGGC CTGGTGCGAGC CTGGCGGCTC TCTGAGACTG TCCTGCGCCG CCTCCGAGTT CACCTTCGGC AGCTGCGTGA TGACCTGGGT CCGACAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAATG GGTGTCGGT ATCTCCGGCT CCGGCGGCTC CACCTACTAC GCCGACTCTG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGGGACA ACTCCAAGAA CACCCTGTAC CTGCAGATGA ACTCCCTGCG GGCCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CAAGACCCCC TGGTGGCTGC GGTCCCCCTT CTTCGATTAC TGGGGCCAGG GCACCCTGGT GACAGTGTCC TCC	11	TCTTACGTGC TGACCCAGCC CCCCTCCGTG TCTGTGGCTC CTGGCCAGAC CGCCAGAATC ACCTGTGGCG GCAACAACAT CGGCTCCACC TCCGTGCACT GGTATCAGCA GAAGCCCGGC CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT GCACGACGAC TCCGACCGGC CTTCTGGCAT CCCTGAGCGG TTCTCCGGCT CCAACTCCGG CAACACCGCC ACCCTGACCA TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC GACGAGGCCG ACTACTACTG CCAAGTGCGA GACTCCTCCT CCGACCACGT GATCTTCGGC GGAGGCACCA AGCTGACCGT GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG CTCCCTCCGT GACCCTG

HL161B	3	CAACTGTTGC TCCAGGAATC CGGTCTGGT CTTGTAAAGC CATCTGAGAC TCTCTCCCTT ACCTGTACCG TTAGCGGAGG AAGTCTTTCC TCAAGCTTCT CCTACTGGGT GTGGATCAGA CAGCCTCCCG GAAAAGGGTT GGAGTGGATT GGCACAATAT ACTACTCCGG CAACACTTAC TATAACCCCA GCCTGAAGAG CAGGCTGACT ATCTCTGTCTG ACACCAGTAA AAATCACTTT TCTCTGAATC TGTCTTCAGT GACCGCAGCC GACACCGCCG TGTATTATTG CGCTCGGCGC GCCGGGATTG TGACAGGCTA TCTGGATTCA TGGGGCCAGG GGACATTGGT TACAGTGTCT AGT	13	TCTTACGTGC TGACCCAGTC CCCCTCCGTG TCCGTGGCTC CTGGCCAGAC CGCCAGAATC ACCTGTGGCG GCAACAACAT CGGCTCCAAG TCCGTGCACT GGTATCAGCA GAAGCCCGGC CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT GTACGACGAC TCCGACCGGC CCTCTGGCAT CCCTGAGCGG TTCTCCGCCT CCAACTCCGG CAACACCGCC ACCCTGACCA TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC GACGAGGCCG ACTACTACTG CCAAGTGTGG GACTCCTCCT CCGACCACGT GGTGTTCCGGC GGAGGCACCA AGCTGACCGT GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG CTCCCTCCGT GACCCTG
HL161BK	5	CAGCTGCTGC TGCAAGAATC CGGCCCTGGC CTGGTGAAAC CCTCCGAGAC ACTGTCCCTG ACCTGCACCG TGTCCGGCGG CTCCCTGTCC TCCAGCTTCT CCTACTGGGT CTGGATCCGG CAGCCCCCTG GCAAGGGCCT GGAATGGATC GGCACCATCT ACTACTCCGG CAACACCTAC TACAACCCCA GCCTGAAGTC CCGGCTGACC ATCTCCGTGG ACACCTCCAA GAACCACTTC AGCCTGAAGC TGTCTCCGT GACCGCCGCT GACACCGCCG TGTAATACTG TGCCAGAAGG GCCGGCATCC TGACCGGCTA CCTGGACTCT TGGGGCCAGG GCACCCTGGT GACAGTGTCC TCC	15	TCTTACGTGC TGACCCAGTC CCCCTCCGTG TCCGTGGCTC CTGGCCAGAC CGCCAGAATC ACCTGTGGCG GCAACAACAT CGGCTCCAAG TCCGTGCACT GGTATCAGCA GAAGCCCGGC CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT GTACGACGAC TCCGACCGGC CCTCTGGCAT CCCTGAGCGG TTCTCCGCCT CCAACTCCGG CAACACCGCC ACCCTGACCA TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC GACGAGGCCG ACTACTACTG CCAAGTGTGG GACTCCTCCT CCGACCACGT GGTGTTCCGGC GGAGGCACCA AGCTGACCGT GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG CTCCCTCCGT GACCCTG
HL161C	7	CAGGTGCAGC TCGTGCAGTC CGGCGCAGAG GTCAAAAAGC CTGGTGCATC TGTGAAAGTG AGTTGCAAGG CTAGCGGCTA CACCTTTACC GGATGTTATA TGCAATTGGT ACGCCAAGCC CCCGGACAAG GCTTGGAATG GATGGGGCGT ATCAACCCAA ACTCTGGCGG GACTAATTAC GCCCAGAAGT TTCAGGGAAG GGTGACTATG ACAAGGGACA CATCCATATC CACCGCTTAT ATGGACCTGT CTCGACTGCG GTCTGATGAT ACAGCCGTTT ATTACTGCGC CAGAGACTAC	17	GACATCCAGA TGACCCAGTC ACCATCATCC CTTTCCGCAT CTGTCCGAGA TAGAGTGAAT ATCACCTGCA GGGCTTCTCA AGGTATTTCC AACTACCTCG CCTGGTTCCA GCAAAAAGCCA GGTAAAGCCC CAAAGAGCTT GATCTACGCC GCTTCTAGTC TGCAGAGTGG AGTTCTTAGT AAGTTCTCCG GCTCTGGCAG TGGCACAGAT TTTACCTTGA CCATTTCCAG CCTGCAGTCT GAGGATTTCC CTACCTACTA TTGTCAGCAG TATGACAGCT ATCCCCCAC ATTTGGGGGG

		AGCGGATGGA GCTTCGATTA TTGGGGGCAG GGTACTTTGG TCACAGTTTC AAGT		GGCACTAAGG TGGAGATAAA ACGGACAGTG GCTGCCCCCTT CTGTCTTTAT T
HL161D	9	CAGCTGCAGT TGCAGGAGTC AGGCCCCGGT TTGGTTAAGC CTTCTGAAAC CCTTCTCTC ACATGCACAG TATCCGGTGG CTCCATCTCC AGTTCAAGTT ACTACTGGGG ATGGATCCGG CAACCCCCAG GAAAAGGGCT GGAGTGGATT GGCAATATAT ATTACTCTGG GTCCACCTAT TACAACCCCT CCCTGATGAG TAGAGTGACC ATCAGCGTGG ACACAAGCAA AAACCAATTC AGCCTGAAGC TTTCTAGCGT GACCGCTGCC GACACAGCTG TCTATTACTG TGCCCGCCAG CTTAGTTATA ACTGGAATGA TAGGCTGTTT GATTACTGGG GCCAGGGGAC TCTCGTTACA GTCAGCAGC	19	AGCTATGAGC TGACCCAGCC TCTGAGCGTA TCTGTCGCTC TCGGCCAGAC AGCCAGAATT ACCTGTGGCG GCAATAACAT AGGATCCAAA AATGTTCACT GGTATCAGCA AAAACCTGGC CAAGCTCCCC TGCTCGTGAT CTACCGGGAC TCTAACCGAC CCAGTGGAAT CCCCGAACGC TTTAGCGGTT CCAACTCTGG AAATACAGCT ACTCTGACTA TCTCCAGGGC TCAGGCCGGG GATGAGGCCG ATTACTACTG CCAGGTGTGG GACTCAAGCA CAGTGGTCTT CGGCGGAGGT ACCAAGTTGA CTGTTCTTGG GCAGCCAAAG GCCGCACCTT CAGTGACCCT G

Таблица 2

Аминокислотные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител против FcRn человека

Название антитела	последовательность вариабельного домена тяжелой цепи		последовательность вариабельного домена легкой цепи	
	SEQ ID NO.	Аминокислотной последовательности	SEQ ID NO.	Аминокислотной последовательности
HL161A	2	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASEFTFG SCVMTWVRQA PGKGLEWVSV ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKTP WWLRSPFFDY WGQGTTLVTVSS	12	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGST SVHWYQQKPG QAPVLVHDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVR DSSSDHVI FG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161B	4	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSL SFSYVWVIR QPPGKLEWI GTIYYSGNTY YNPSLKSRLT ISVDTSKNHF SLNLSSVTAA DTAVYYCARR AGILTGYLDS WGQGTTLVTVSS	14	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHV VFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161BK	6	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSL SFSYVWVIR QPPGKLEWI GTIYYSGNTY YNPSLKSRLT ISVDTSKNHF SLKLSSVTAA DTAVYYCARR AGILTGYLDS WGQGTTLVTVSS	16	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHV VFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161C	8	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GCMHWVRQA	18	DIQMTQSPSS LSASVGD RVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP
		PGQGLEWMGR INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MDLSRLRSDD TAVYYCARDY SGWSFDYWGQ GTLVTVSS		GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGTD FTLTISLQS EDFATYYCQQ YDSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFI
HL161D	10	QLQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSL SSSYYGWVIR QPPGKLEWI GNIYYSGSTY YNPSLMSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCARQ LSYNWNDRLF DYWGQGT LVT VSS	20	SYELTQPLSV SVALGQTARI TCGGNNIGSK NVHWYQQKPG QAPVLVIYRD SNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRQAAG DEADYYCQVW DSSTVVFGGG TKLTVLGQPK AAPSVTL

Таблица 3

Последовательности CDR переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи
выбранных антител против FcRn человека

антитело	CDR переменного домена тяжелой цепи			CDR переменного домена легкой цепи		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
SEQ ID NO.	21	22	23	24	25	26
HL161A	SCVMT	VISGSGGS TYYADSVK G	TPWWLRSP FFDY	GGNNIGST SVH	DDSDRPS	VRDSSSDH VI
SEQ ID NO.	27	28	29	30	31	32
HL161B (HL161BK)	FSYWV	TIIYSGNT YYNPSLKS	RAGILTGY LDS	GGNNIGSK SVH	DDSDRPS	QVWDSSSD HVV
SEQ ID NO.	33	34	35	36	37	38
HL161C	GCYMH	RINPNSGG TNYAQKFQ G	DYSGWSFD Y	RASQGISN YLA	AASSLQS	QQYDSYPP TF
SEQ ID NO.	39	40	41	42	43	44
HL161D	SYWVG	NIYYSGST YYNPSLMS	QLSYNWND RLFDY	GGNNIGSK NVH	RDSNRPS	QVWDSSSTV V

Пример 4. Измерение аффинности связывания антигена антителами HL161A/HL161B/HL161C/HL161D с помощью SPR.

Аффинности связывания HL161A, HL161B, HL161C и HL161D антител измеряли с помощью SPR путем иммобилизации водорастворимого hFcRn в качестве лиганда на чипе Proteon GLC (Bio-Rad) и измерения аффинности. Кинетический анализ проводили с использованием системы Proteon XPR36. shFcRn иммобилизовали на чипе GLC и образцы антител давали реагировать при концентрации 5, получали результаты сенсограммы. В кинетическом анализе 1:1 использовали модель связывания Ленгмюра, анализ повторяли шесть раз при каждом из pH 6,0 и pH 7,4 и вычисляли среднее значение KD. После стадии иммобилизации чип активировали в условиях EDAC/NHS 0,5X, 30 мкл/мин и 300 с. Для иммобилизации shFcRn разводили в ацетатном буфере (pH 5,5) до концентрации 2 мкг/мл и 250 мкл и разбавлению позволяли протекать на чипе со скоростью 30 мкл/мин. При достижении степени иммобилизации 200-300 RU реакцию прекращали. Затем проводили дезактивацию с использованием этаноламина со скоростью 30 мкл/мин в течение 300 с. Каждое из антител HL161 серийно разбавляли в 2 раза с концентрацией от 10 нМ до 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,625 нМ, 0,312 нМ и т.д., тем самым получая образцы. Разведение образца проводили с использованием 1X PBST (pH 7,4) или 1X PBST (pH 6,0) при каждом значении pH. Для анализа образцов ассоциацию проводили при 50 мкл/мин в течение 200 с, а стадию диссоциации проводили при 50 мкл/мин в течение 600 с, после чего регенерацию проводили с использованием глицинового буфера (pH 2,5) при 100 мкл/мин в течение 18 с. Кинетический анализ каждого образца повторяли шесть раз, а затем измеряли среднюю аффинность связывания антигена (KD). Кинетические параметры антител, которые были получены анализом SPR, приведены ниже в табл. 4 (фиг. 2а-2h).

Таблица 4

Результаты кинетического анализа антител с помощью SPR с иммобилизованным человеческим FcRn

Антитело	pH 6,0			pH 7,4		
	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (M)$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (M)$
HL161A	$1,81 \times 10^6$	$3,26 \times 10^{-4}$	$1,80 \times 10^{-10}$	$1,32 \times 10^6$	$3,27 \times 10^{-4}$	$2,47 \times 10^{-10}$
HL161B	$9,12 \times 10^5$	$7,35 \times 10^{-4}$	$8,07 \times 10^{-10}$	$7,10 \times 10^5$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,76 \times 10^{-9}$
HL161C	$1,74 \times 10^6$	$3,32 \times 10^{-4}$	$1,91 \times 10^{-10}$	$1,36 \times 10^6$	$3,16 \times 10^{-4}$	$2,32 \times 10^{-10}$
HL161D	$9,70 \times 10^5$	$1,38 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-9}$	$6,99 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-3}$	$1,78 \times 10^{-9}$
hIgG ₁	$3,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-9}$	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания

Пример 5. Анализ связывания антител HL161A/HL161B с человеческим FcRn с помощью FACS.

С помощью FcRn-экспрессирующих стабильных клеток HEK293 человека связывание с FcRn при каждом значении pH анализировали с использованием системы FACS. Тест связывания с FcRn с использованием FACS проводили в реакционном буфере при pH 6,0 и pH 7,4. В частности, 100000 стабильных HEK293 экспрессирующих FcRn человека промывали буфером PBS и центрифугировали в настольной микроцентрифуге при 4500 об/мин в течение 5 мин для получения клеточного осадка. Антитело добавляли к 100 мкл pH 6,0 или pH 7,4 PBS/10 mM ЭДТА. Оставшиеся клеточные осадки суспендировали в реакционном буфере и проводили подсчет клеток. Добавляли 10 мкл клеточной суспензии на стекло и подсчитывали количество клеток в суспензии клеток в системе TC10, после чего клеточную суспензию разбавляли реакционным буфером до концентрации клеток 2×10^6 клеток/мл. Каждый образец антитела разводили до 500 нМ. Для анализа при pH 6,0 разбавление доводили до 20 нМ в 96-луночной планшете с лунками с v-образным дном и 50 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку. Для анализа при pH 7,4 500 нМ антительного образца разбавляли 3-кратным серийным разведением и анализировали при концентрации в диапазоне от 250 нМ до 0,11 нМ. 50 мкл клеток, разбавленных до 2×10^6 клеток/мл, добавляли в каждую лунку и суспендировали. Планшет помещали в ротатор при 4°C и перемешивали под углом 15° со скоростью 10 об/мин в течение 90 мин. После завершения реакции планшет вынимали из ротатора и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин, после чего удаляли надосадочную жидкость. Анти-hlgG козырь антитело с A488 разводили в соотношении 1:200 в реакционном буфере и 100 мкл разведенного антитела добавляли в каждую лунку и суспендировали. Затем планшет снова устанавливали в ротатор при 4°C и вращали под углом 15° со скоростью 10 об/мин в течение 90 мин. После завершения реакции планшет извлекали из ротатора и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин, а надосадочную жидкость удаляли. После этого проводили процедуру промывки еще раз, 100 мкл реакционного буфера добавляли в каждую лунку для растворения клеточных осадков и планшет переносили в синюю тестовую пробирку. Затем добавляли 200 мкл реакционного буфера в каждую лунку, после чего проводили измерение с помощью FACS. Измерение FACS проводили в следующих условиях: FS 108 B, SS 426 B, FL1 324 B, FL2 300 B. Эти клетки анализировали с помощью FACS с использованием программного обеспечения BD FACSDiva™ v6.1.3 (BD Bioscience). Результаты представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) (фиг. 3).

Антитела HL161A и HL161Ba показали значения MFI 10,59 и 8,34, соответственно, при концентрации 10 нМ и pH 6,0. При pH 7,4 и концентрации 0,11-250 нМ антитела показали значения EC₅₀ (эффективная концентрация 50%) 2,46 нМ и 1,20 нМ, соответственно, что было проанализировано с помощью 4 параметрической логистической регрессии с использованием значений MFI.

Пример 6. Анализ блокирующих эффектов HL161A/HL161B антител с помощью FACS.

Клетки HEK293, экспрессирующие hFcRn на поверхности клетки, обрабатывали двумя антителами, анализировали аффинность их связывания с человеческим FcRn на клеточной поверхности и исследовали блокирующие эффекты антител на основании уменьшения связывания Alexa-Fluo-488-меченных hlgG1. Процедуру анализа проводили следующим образом.

2 мл 1×10^6 TE добавляли к каждому типу наивных клеток HEK293 и HEK293, стабильно сверхэкспрессирующих FcRn человека, которые инкубировали в 5% CO₂ инкубаторе при температуре 37°C в течение 1 мин. Клетки извлекали из флаконов для культивирования и добавляли 8 мл реакционного буфера (pH 6,0), после чего клетки переносили в 50 мл коническую пробирку. Суспензию клеток центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин для удаления надосадочной жидкости, и 1 мл реакционного буфера (pH 6,0) добавляли к каждому осадку клеток. Затем клеточную суспензию переносили в новую 1,5 мл пробирку Eppendorf. После этого клеточную суспензию центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Затем реакционный буфер (pH 6,0) добавляли к оставшемуся осадку клеток и подсчитывали число клеток в суспензии клеток. И, наконец, клеточную суспензию разбавляли реакционным буфером до концентрации клеток $2,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Каждый образец антитела разводили до 400 нМ, а затем разводили 4-кратным серийным разведением в 96-луночной планшете с лунками с v-образным дном. Добавляли в каждую лунку 50 мкл образца, разведенного до конечной концентрации 200 нМ до 0,01 нМ. Затем добавляли в каждую лунку 10 мкл Alexa488-hlgG1, разбавленного до 1 мкМ реакционным буфером (pH 6,0). И, наконец, 40 мкл клеток, разведенных до концентрации клеток $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, добавляли в каждую лунку и суспендировали. Планшет устанавливали в ротатор при 4°C и вращали под углом 15° со скоростью 10 об/мин в течение 90 мин. После завершения реакции планшет извлекали из ротатора и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин для того, чтобы удалить надосадочную жидкость. 100 мкл реакционного буфера добавляли в каждую лунку для того, чтобы растворить клеточные осадки, и планшет переносили в синюю тестовую пробирку. Затем добавляли в каждую лунку 200 мкл реакционного буфера и осуществляли измерение с помощью FACS. Измерение FACS проводили при следующих условиях: FS 108 B, SS 426 B, FL1 324 B, FL2 300 B. Эти клетки анализировали с помощью FACS с использованием программного обеспечения BD FACSDiva™ v6.1.3 (BD Bioscience). Результаты выражали в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI). MFI тестовой группы обрабатывали после вычитания измеренного значения MFI кле-

ток отдельно (фоновый сигнал). Рассчитали процент MFI для пробирки, содержащей конкурент, относительно 100% от контрольной пробирки (отдельно Alexa Fluor 488 без конкурента).

$$(\%) \text{ блокирования} = \left\{ \frac{\text{MFI стабильного hFcRn (Конкурент + A488 - pIgG1)} - \text{MFI HEK293 (A488 - pIgG1)}}{\text{MFI стабильного hFcRn (A488 - pIgG1)} - \text{MFI HEK293 (A488 - pIgG1)}} \right\} \times 100$$

Когда MFI был ниже, чем MFI пробирки, содержащей конкурент-человеческий IgG1, антитело-конкурент определяли как имеющее высокий коэффициент конкуренции. На основании измеренных блокирующих эффектов (%) антител HL161A и HL161B в условиях pH 6,0 и концентрации 0,01-200 нМ была выполнена 4-параметрическая логистическая регрессия. В результате было показано, что антитела HL161A и HL161B показали значения IC₅₀ (50% ингибирующая концентрация) 0,92 нМ и 2,24 нМ, соответственно (фиг. 4).

Пример 7. Тест влияния HL161A/HL161B в mFcRn +/- hFCRN трансгенных 32 (Tg32) мышах.

Человеческие IgG вводили мышам Tg32 (hFcRn +/+, hβ2m +/+, mFcRn +/-, mβ2m +/-), экспрессирующим человеческий FcRn (Jackson Laboratory), а затем мышам вводили HL161A и HL161B вместе с человеческим IgG для того, чтобы исследовать, будут ли эти антитела влиять на катаболизм человеческого IgG.

Антител HL161A и HL161Ba и человеческий IgG (Greencross, IVglobulinS) распределяли для 4-дневного введения в дозе 5, 10 и 20 мг/кг и хранили, а в качестве носителя использовали буфер PBS (фосфатно-солевой буфер) (pH 7,4), и 20 мг/кг IgG1 контроль. Мышей Tg32 с человеческим FcRn адаптировали в течение 7 дней и давали воду и корм вволю. Температура (23±2°C), влажность (55±5%) и циклы 12 ч свет/12 ч тень контролировали автоматически. Каждая группа животных состояла из 4 мышей. Для использования человеческого IgG в качестве трэйсера получали биотин-конъюгированные hIgG с использованием набора (Pierce, Cat # 21327). В момент времени 0 ч 5 мг/кг биотин-hIgG и 495 мг/кг человеческого IgG вводили внутривенно для насыщения IgG in vivo. Через 24, 48, 72 и 96 ч после введения биотин-IgG каждое лекарственное средство вводили внутривенно в дозах 5, 10 и 20 мг/кг один раз в день. Для сбора крови мышей подвергали легкой анестезии изофлураном (JW Pharmaceutical), а затем собирали кровь из ретроорбитального сплетения с использованием гепаринизированных капиллярных трубок Micro-hematocrit (Fisher) через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч после введения биотина-IgG. Через 24, 48, 72 и 96 ч лекарственное средство вводили после забора крови. Сразу же после помещения 0,1 мл цельной крови в пробирку Eppendorf плазму отделяли центрифугированием и хранили в морозильной камере глубокой заморозки (Thermo) при -70°C до анализа.

Уровень биотин-hIgG1 в собранной крови анализировали с помощью ELISA следующим образом. 100 мкл нейтравидина (Pierce, 31000) добавляли в 96-луночный планшет (Costar, Кат. № 2592) в концентрации 1,0 мкг/мл, а затем покрывали при 4°C в течение 16 ч. Планшет промывали три раза буфером А (0,05% Tween-20, 10 mM PBS, pH 7,4), а затем инкубировали в 1% BSA-содержащего PBS (pH 7,4), буфер при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем планшет трижды промывали буфером А, а затем планшет с нейтравидином готовили с буфером PBS (pH 7,4), содержащим 0,5% бычьего сывороточного альбумина, в концентрации 1 мкг/мл. Образец крови последовательно разводили 500-1000 раз в буфере В (100 mM MES, 150 mM NaCl, 0,5% BSA без IgG, 0,05% Tween-20, pH 6,0) и 150 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку планшета. Добавленный образец оставляли реагировать при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем планшет трижды промывали буфером А, а затем добавляли в каждую лунку 200 мкл 1 нМ античеловеческого IgG козьего антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Затем планшет трижды промывали охлажденным льдом буфером В, а затем 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (RND, кат. № DY999) добавляли в каждую лунку и давали реагировать при комнатной температуре в течение 15 мин. 50 мкл 1,0 М раствора серной кислоты (Samchun, кат. № S2129) добавляли в каждую лунку для остановки реакции, после чего измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм.

Концентрация биотин-IgG через 24 ч (около T_{max} биотин-IgG у мышей, до появления катаболизма биотин-IgG) была принята за 100%, а проценты от концентрации в другие моменты времени по отношению к концентрации в 24 ч показаны на фиг. 10. Результаты анализа показали, что период полураспада носителя и 20 мкг/кг контрольных IgG1 20 мг составили 103 ч и 118 ч соответственно. Тем не менее, период полураспада IgG в крови в случае антитела HL161A, которое показало отличную аффинность связывания с человеческим FcRn и блокирующий эффект в in vitro анализе и более быстрый катаболизм IgG в мышах Tg32 трансгенных по FcRn человека, составил 30, 23 и 18 ч в различных дозах. Кроме того, антитело IgG HL161B показало период полураспада 41, 22 и 21 ч. Это говорит о том, что pH-независимые и Fc-неконкурентные антитела к hFcRn действуют на увеличение катаболизма эндогенных антител (фиг. 5a и 5b).

Пример 8. Тест на влияние HL161A/HL161B у обезьян.

С помощью макак, имеющих гомологию 96% с человеческим FcRn, анализировали уровни обезьяньих IgG, IgA, IgM и альбумина при введении антител HL161A и HL161B и исследовали фармакокинетические (ФК) профили антител.

1) Анализ изменений в экспрессии иммуноглобулина G в крови обезьян.

Во-первых, изменение обезьяньих IgG измеряли с помощью ELISA. 100 мкл антитела против чело-

вещеского IgG, Fc (BethylLab, A80-104A) загружали в каждую лунку 96-луночного планшета (Costar, Кат. № 2592) в концентрации 4,0 мкг/мл, а затем покрывали при 4°C в течение 16 ч. Планшет промывали три раза промывочным буфером (0,05% Tween-20, 10 мМ PBS, pH 7,4), а затем инкубировали с буфером PBS (pH 7,4), содержащим 1% BSA, при комнатной температуре в течение 2 ч. Стандартные обезьяньи IgG использовали в концентрации 3,9-500 нг/мл, и образец крови разводили 80000 раз в буфере PBS (pH 7,4), содержащем 1% BSA, и разбавленным загружали в пластину и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем планшет трижды промывали промывочным буфером, а затем 100 мкл 20000-кратного разведения анти-hIgG антитела (Biorad, 201005) загружали в планшет и оставляли реагировать при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки каждого планшета в планшет загружали 100 мкл раствора субстрата 3,3',5,5'-тетрамилбензидина (RND, кат. № DY999) и оставляли реагировать при комнатной температуре в течение 7 мин, после чего 50 мкл 1,0 М раствора серной кислоты (Samchun, кат. № S2129) добавляли в каждую лунку для остановки реакции. Для анализа оптическую плотность (OD) измеряли с использованием ридера оптической плотности при 450 нм и 540 нм (MD, модель: VersaMax). В результате было показано, что когда каждое из антител HL161A и HL161B вводили внутривенно макакам в дозах 5 и 20 мг/кг один раз в неделю, уровень обезьяньих IgG снизился дозозависимым образом, и антитело HL161 эффективно блокировало взаимодействие IgG-FcRn. 5 мг/кг HL161A снижает уровень IgG обезьяны до 47,1% на 9-й день, а 20 мг/кг HL161A снижает уровень IgG обезьяны до 29,6% на 10 день, 5 мг/кг HL161B снижали уровень IgG обезьяны до 53,6% на 10-й день и 20 мг/кг HL161B снижали уровень IgG обезьяны до 31% на 9-й день, что позволяет предположить, что два антитела показали схожие результаты (табл. 5 и фиг. 6А и 6С). Кроме того, сравнивали изменение уровня обезьяньего IgG путем внутривенного введения HL161A и HL161B между индивидуумами, и в результате было показано, что уровень обезьяньих IgG снизился между индивидуумами очень похожим образом.

Таблица 5

Изменение (%) уровня обезьяньих IgG при введении HL161A и HL161B

День	Носитель	HL161A		HL161B	
		5 мг/кг	20 мг/кг	5 мг/кг	20 мг/кг
0 день	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
0,5 день	99,0±4,8	81,5±1,8	101,5±9,0	94,3±5,4	96,2±3,0
1 день	97,6±15,9	67,2±2,0	86,2±11,9	83,9±24,7	94,1±7,0
2 день	97,8±6,2	63,0±3,3	74,2±14	73,7±11,3	71,7±5,4
3 день	104,5±13,1	61,8±8,0	59,2±11,0	68,3±9,3	61,3±6,0
4 день	100,9±16,7	55,3±4,1	45,1±4,6	65,5±12,2	44,3±5,6
5 день	103,4±12,5	60,8±8,3	38,8±4,9	65,0±11,9	38,4±3,7
6 день	113,3±8,5	64,9±11,7	39,7±6,4	66,4±11,3	39,0±5,4
7 день	116,9±23,3	58,7±4,7	39,6±5,4	61,4±8,0	37,5±3,2
7,5 день	92,4±10,4	51,2±7,2	38,7±7,8	62,8±8,3	39,3±0,4
8 день	94,6±8,7	48,0±9,3	36,1±5,3	60,7±7,5	39,6±5,9
9 день	117,6±14,3	47,1±4,4	33,8±5,0	54,3±6,9	31,0±3,1
10 день	115,1±16,7	49,7±8,9	29,6±5,8	53,6±4,9	32,8±4,3
11 день	114,6±18,9	47,7±4,2	30,4±6,5	54,7±4,2	39,9±9,1
12 день	109,5±13,1	51,7±3,1	32,9±5,7	56,5±4,7	46,7±9,1
13 день	111,1±21,2	52,9±6,4	35,7±9,2	58,7±3,8	45,4±7,6
14 день	128,9±17,7	54,7±4,2	37,8±9,6	60,6±4,2	53,8±11,3
17 день	95,6±6,6	59,5±10,3	40,2±7,4	56,7±4,4	48,4±10,0
20 день	92,5±8,4	62,4±6,7	47,6±8,9	61,8±6,0	54,0±9,5
23 день	107,1±15,2	71,9±6,5	61,8±13,3	64,9±4,4	56,8±6,0
26 день	104,0±5,6	77,7±6,8	72,2±22,4	70,8±7,4	62,4±5,8
29 день	102,4±8,3	81,4±6,7	77,9±20,5	74,8±5,1	65,4±10,8

2) Анализ фармакокинетических профилей HL161A/HL161B в крови обезьян.

Времязависимые фармакокинетические (ФК) профили HL161A и HL161B после внутривенного введения анализировали с помощью конкурентного ELISA. В частности, был приготовлен раствор 2 мкг/мл нейтравидина, и 100 мкл раствора наносили в каждую лунку 96-луночного планшета и затем инкубировали при 4°C в течение 18 ч. Планшет промывали три раза 300 мкл промывочного буфера (0,05% Tween 20, содержащего 10 мМ PBS, pH 7,4), а затем каждую лунку инкубировали с буфером PBS (pH 7,4), содержащим 1% BSA при 25°C в течение 2 ч. Биотинилированный hFcRn разбавляли PBS до концентрации 1 мкг/мл, а затем 100 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Затем планшет промывали три раза 300 мкл промывочного буфера для удаления несвязанного hFcRn, а затем стандартный образец (0,156-20 нг/мл) добавляли в каждую лунку и инкубировали при 25°C в течение 2 ч. Затем планшет промывали три раза промывочным буфером и 100 мкл 1:10000 разбавления антител в PBS добавляли в каждую лунку и инкубировали при 25°C в течение 1,5 ч. Планшет окончательно промывали три раза и 100 мкл раствора ТМБ добавляли в каждый буфер и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего добавляли в каждую лунку 50 мкл 1 М серной кислоты в качестве раствора для остановки реакции. Затем измеряли оптическую плотность при 450 нм с помощью ридера для микропланшетов. Результаты анализа для HL161A и HL161B приведены ниже в табл. 6, и, как можно видеть из нее, фармакокинетический профиль антител вырос дозозависимым образом. Период полужизни (T_{1/2}) антител составлял около 6-12 дней, что было меньше, чем в целом у известных антител. Кроме того, было показано, что период полураспада, при наблюдении относительно общего, AUC и C_{max} у HL161B были выше, чем у HL161A (фиг. 7а и 7б).

Таблица 6

Результаты анализа фармакокинетических профилей HL161A и HL161B в различных дозах

Ab (доза)	День	C _{max} (мг/мл)	AUC (мг/мл.ч)	T _{1/2} (ч)
HL161A (5 мг/кг)	0-7	157 ± 31	1,601 ± 501	6,9 ± 0,9
	7-14	157 ± 25	1,388 ± 334	10,3 ± 2,8
HL161A (20 мг/кг)	0-7	692 ± 138	13,947 ± 2,459	9,0 ± 0,6
	7-14	724 ± 125	12,699 ± 2,114	7,6 ± 1,6
HL161B (5 мг/кг)	0-7	178 ± 56	2,551 ± 1,356	7,9 ± 1,3
	7-14	187 ± 9	2,772 ± 466	9,4 ± 0,5
HL161B (20 мг/кг)	0-7	823 ± 38	21,867 ± 1,088	11,7 ± 1,0
	7-14	868 ± 66	16,116 ± 1,501	± 0,9

3) Анализ изменения уровня антител класса IgM и IgA в крови обезьян.

Анализ ELISA для измерения уровня IgM и IgA в крови обезьяны проводили способом, аналогичным способу ELISA для измерения уровня IgG. В частности, 100 мкл IgM антитела против антител обезьян (Alpha Diagnostic, 70033) или IgA-антитела (Alpha Diagnostic, 70043) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета в концентрации 2,0 мкг/мл, а затем покрывали при 4°C в течение 16 ч. Планшет промывали три раза промывочным буфером (0,05% Tween-20, содержащий 10 мМ PBS, pH 7,4), а затем инкубировали с буфером PBS (pH 7,4), содержащим 1% BSA, при комнатной температуре в течение 2 ч. Стандартные обезьяны IgM анализировали при концентрации 7,8-1000 нг/мл, а IgA-15,6-2000 нг/мл. Образец крови разводили 10000- или 20000 раз в буфере PBS (pH 7,4), содержащем 1% BSA, и разведения добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем планшет трижды промывали промывочным буфером, после чего добавляли 100 мкл 5000-кратного разведения вторичного антитела против IgM обезьяны (Alpha Diagnostic, 70031) и вторичного антитела против IgA обезьяны (KPL, 074-11-011) в каждую лунку и давали реагировать при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет окончательно промывали три раза и по 100 мкл раствора субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (RND, кат. № DY999) добавляли в каждую лунку и давали реагировать при комнатной температуре в течение 7 мин. Затем добавляли 50 мкл 1,0 М раствора серы (Samchun, кат. № S2129) в каждую лунку для остановки реакции. Оптическую плотность в каждой лунке измеряли с помощью ридера оптической плотности при 450 и 540 нм (MD, Model: VersaMax).

4) Анализ изменения уровня альбумина в крови обезьян.

Анализ изменения альбумина уровня в крови обезьяны проводили с использованием коммерческого набора ELISA (Assaypro, кат. № ЕКА2201-1). Вкратце обезьянью сыворотку в качестве тестируемого образца разводили в 4000 раз и 25 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета, покрытого антителом, способным связываться с альбумином обезьяны. 25 мкл биотинилированного раствора альбумина обезьян, добавляли в каждую лунку и инкубировали при 25°C в течение 2 ч.

Планшет промывали три раза 200 мкл промывочного буфера, а затем добавляли 50 мкл 1:100 разбавления антитела конъюгированного с стрептавидином-пероксидазой в каждую лунку и инкубировали при 25°C в течение 30 мин. Планшет окончательно промывали три раза, а затем добавляли 50 мкл субстрата в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем 50 мкл реакционного останавливающего раствора добавляли в каждую лунку и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. В результате, явных изменений в уровнях обезьяньих IgM, IgA и альбумина при введении антител HL161A и HL161B не наблюдались в течение всего периода испытаний (фиг. 8а-8с). Таким образом, можно сделать вывод, что антитело HL161 воздействует только на уровни IgG и не влияет на уровни IgM и IgA, что позволяет предположить, что данное антитело не окажет существенного влияния на снижение иммунитета снижением уровня иммуноглобулинов. Кроме того, не наблюдалось никаких существенных изменений в уровне обезьяньего альбумина в течение всего периода испытания, что свидетельствует о том, что антитела HL161A и HL161B специфически блокируют только взаимодействия IgG-FcRn.

5) Биохимический анализ крови и анализ компонентов мочи И, наконец, проводили биохимический анализ крови и анализ мочи при введении антител с использованием образцов 14-го дня испытаний. Биохимические маркеры крови, в том числе аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (АЛФ), креатинфосфокиназа (СРК), общий билирубин (ТБЛ), глюкоза (ГЛУ), общий холестерин (ТХО), триглицериды (ТГ), общий белок (ТБ), альбумин (Алб), альбумин/глобулин (А/Г), азот мочевины крови (ВУН), креатинин (СРЕ), неорганический фосфор (ИФ), кальций (Са), натрий (На), калий (К) и хлорид (Сл), анализировали с использованием системы Hitachi 7180. Кроме того, аналитические маркеры мочи, в том числе лейкоциты (ЛЕУ), нитрат (НИТ), уробилиноген (УРО), белок (ПРО), рН, скрытую кровь (БЛО), удельную плотность (СГ), кетоновые тела (КЕТ), нилирубин (БЛ), глюкозу (ГЛУ), и аскорбиновую кислоту (АСК), анализировали с использованием системы Mission U120. Хотя были небольшие изменения в уровнях, измеренные уровни попадали в нормальные диапазоны уровней у макаков.

Хотя настоящее изобретение было подробно описано со ссылкой на специфические признаки, специалистам в данной области будет очевидно, что это описание предназначено только для иллюстративных целей и не ограничивает объем настоящего изобретения. Таким образом, существенный объем настоящего изобретения будет определен приложенной формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное анти-FcRn антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варируемую область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и варируемую область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

2. Выделенное анти-FcRn антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варируемую область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и варируемую область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

3. Выделенное анти-FcRn антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варируемую область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и варируемую область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

4. Выделенное анти-FcRn антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варируемую область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и варируемую область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

5. Выделенное анти-FcRn антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варируемую область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и варируемую область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что антитело связывается с FcRn со значением KD (константа диссоциации) от 0,01 до 2 нМ в условиях pH 6,0 или pH 7,4.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что антитело или его фрагмент включают полноразмерные антитела, Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv, минитела или интралета.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что антитело включает антитела IgD, антитела IgE, антитела IgM, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела

IgG3, антитела IgG4.

9. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 13, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

10. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 15, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

11. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 11, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

12. Рекombинантный экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 15, кодирующую вариабельную область легкой цепи, или последовательность SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 13, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

13. Рекombинантный экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 11, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

14. Клетка-хозяин для экспрессии анти-FcRn антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, которая трансфицирована рекombинантным экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, который кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 15, кодирующую вариабельную область легкой цепи, или последовательность SEQ ID NO: 3, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 13, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

15. Клетка-хозяин для экспрессии анти-FcRn антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, которая трансфицирована рекombинантным экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, который кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность SEQ ID NO: 11, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

16. Способ получения анти-FcRn антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, включающий

культивирование клетки-хозяина по п.14 или 15 и получение антитела из нее и

выделение и очистку полученного антитела для извлечения антитела, специфически связывающегося с FcRn.

17. Фармацевтическая композиция для лечения аутоиммунного заболевания, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

18. Применение фармацевтической композиции по п.17 для создания медикамента, предназначенного для лечения пациента, страдающего аутоиммунным заболеванием.

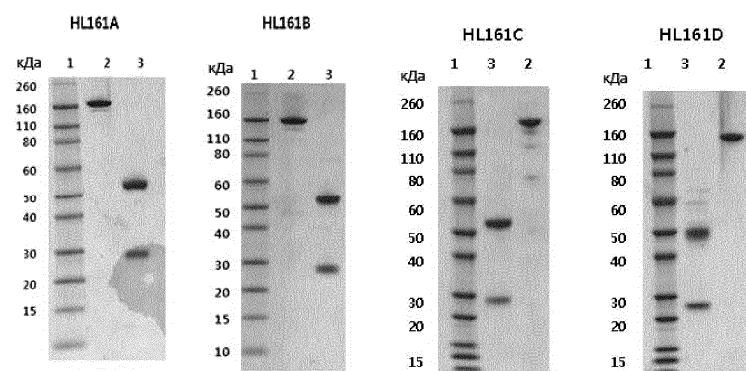
19. Применение по п.18, отличающееся тем, что аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание, выбранное из группы, состоящей из иммунной нейтропении, синдрома Гийена-Барре, аутоиммунной эпилепсии, аутоиммунного энцефалита, синдрома Исаака, аутоиммунного синдрома невуса, пузырчатки обыкновенной, эксфолиативной пузырчатки, буллезного пемфигоида, приобретённого буллезного эпидермолиза, пемфигоида беременных, пузырчатки слизистой оболочки, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунной анемии, аутоиммунной базедовой болезни, синдрома Гудпасчера, тяжелой псевдопаралитической миастении, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, волчаночного нефрита и мембранозной нефропатии.

20. Диагностическая композиция для детекции FcRn *in vitro* или *in vivo*, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-8, меченные детектируемой меткой.

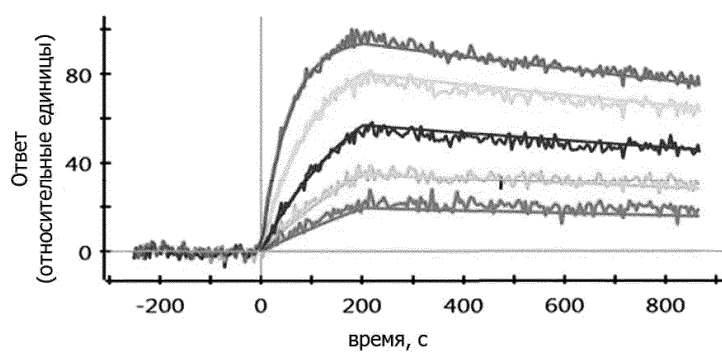
21. Способ обнаружения FcRn *in vitro*, включающий

приведение образца в контакт с антителом, связывающим FcRn или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-8;

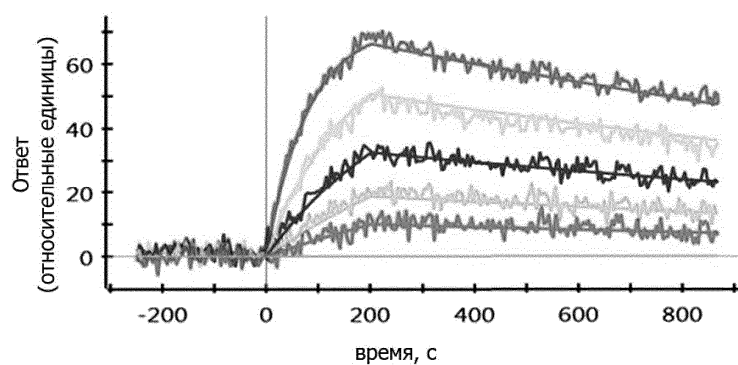
детекцию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанных с FcRn.



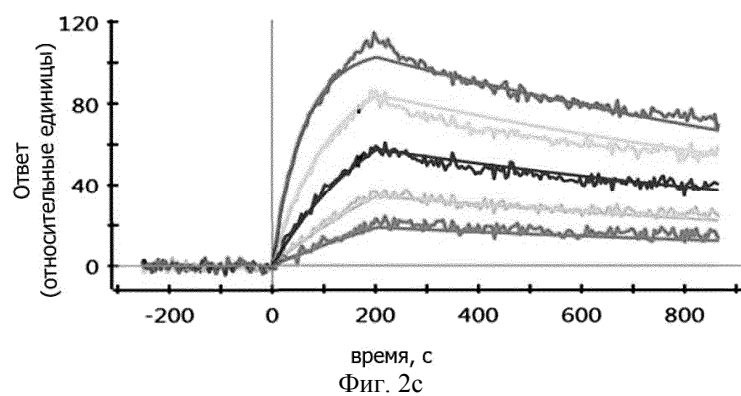
Фиг. 1



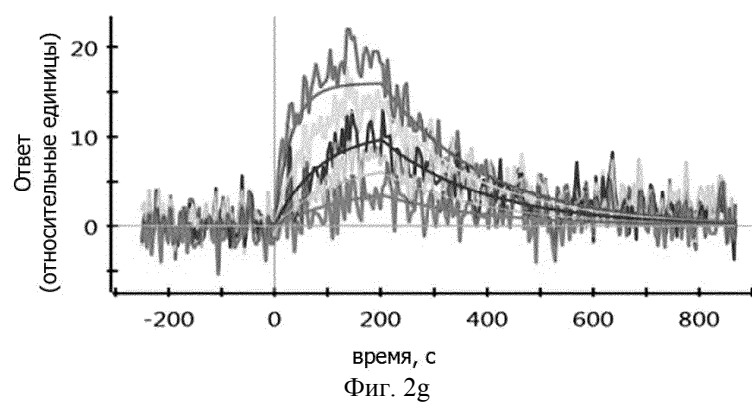
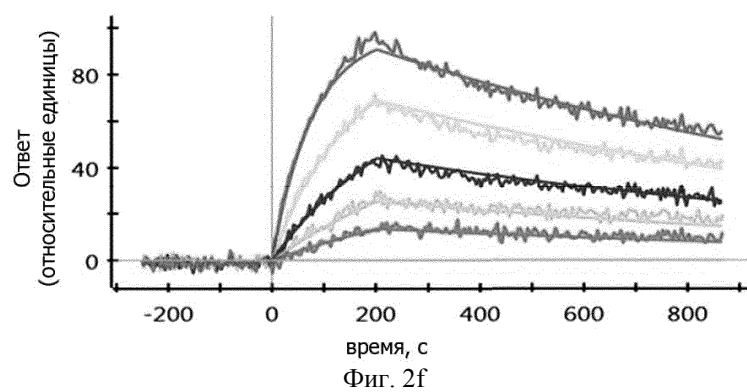
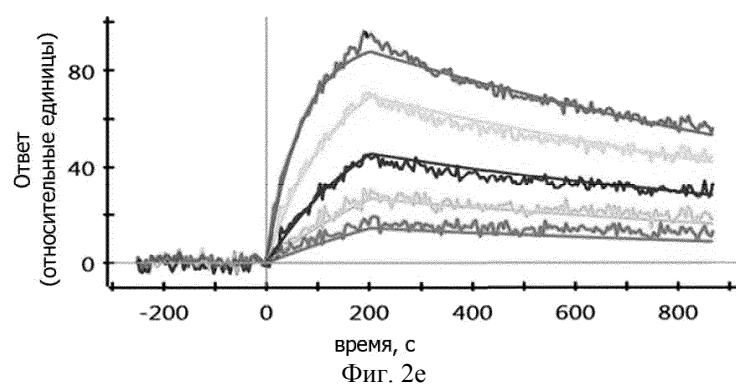
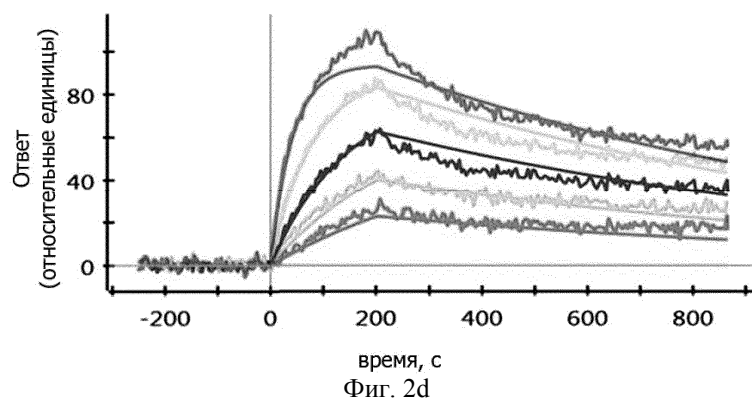
Фиг. 2а

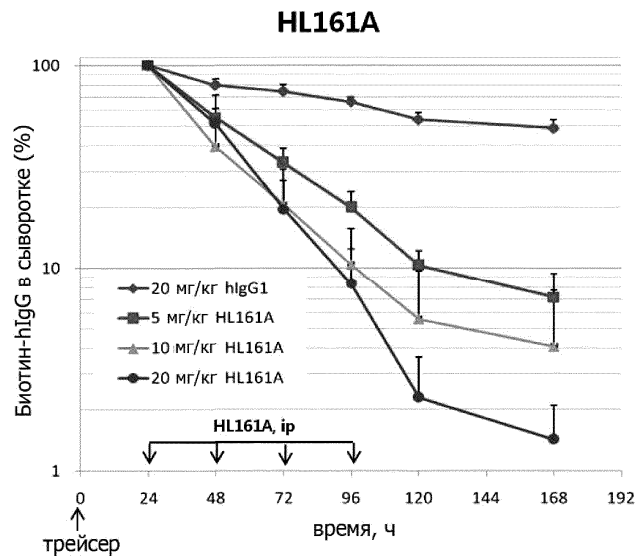
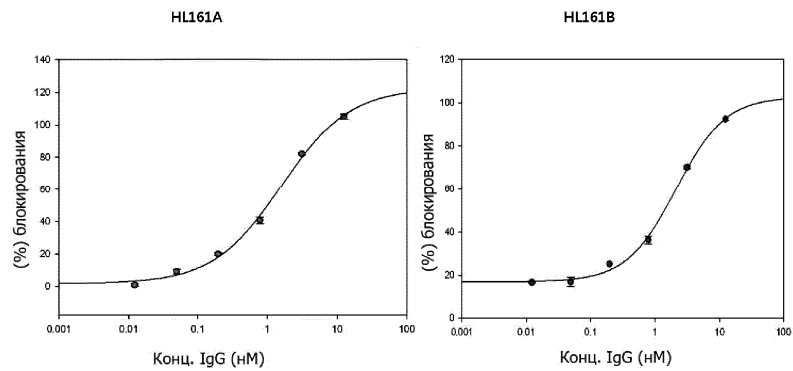
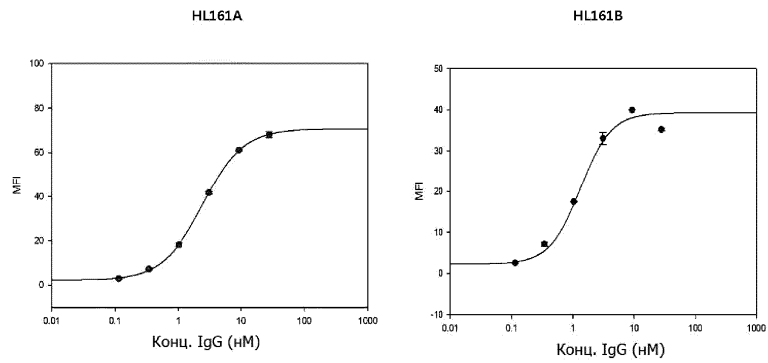
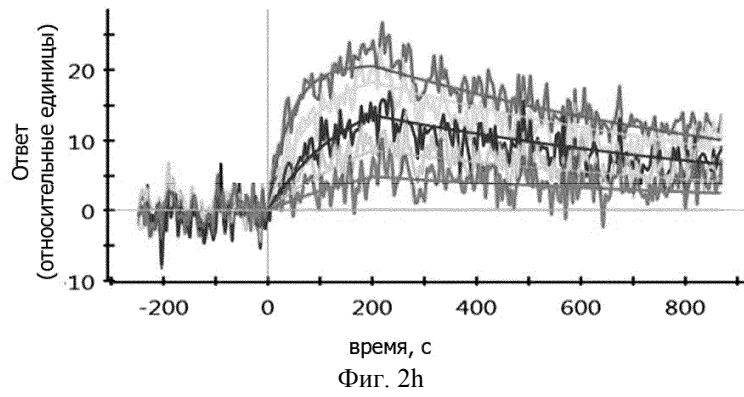


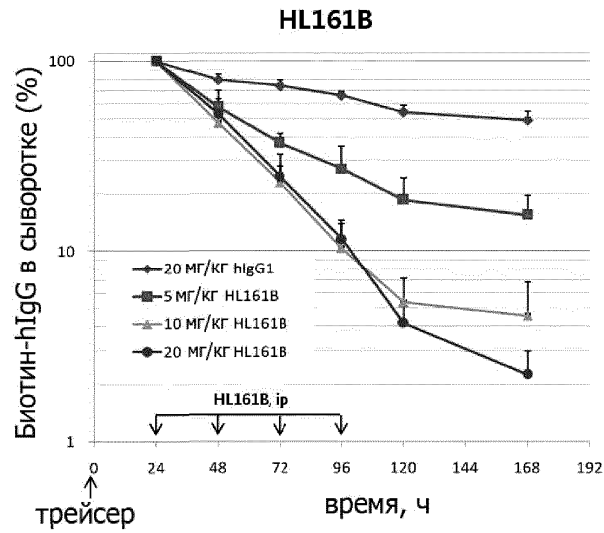
Фиг. 2b



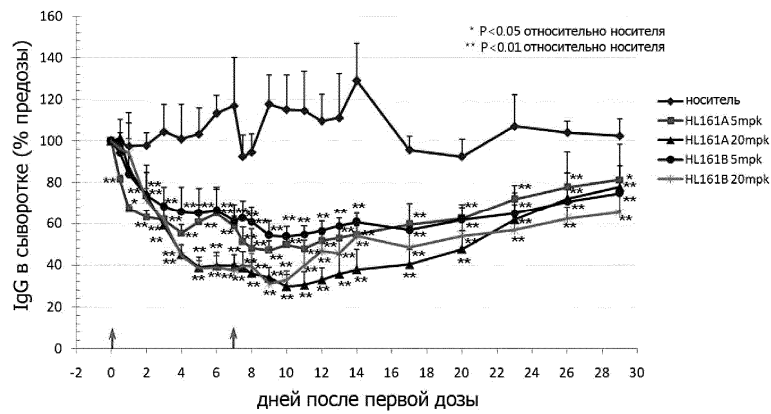
Фиг. 2с



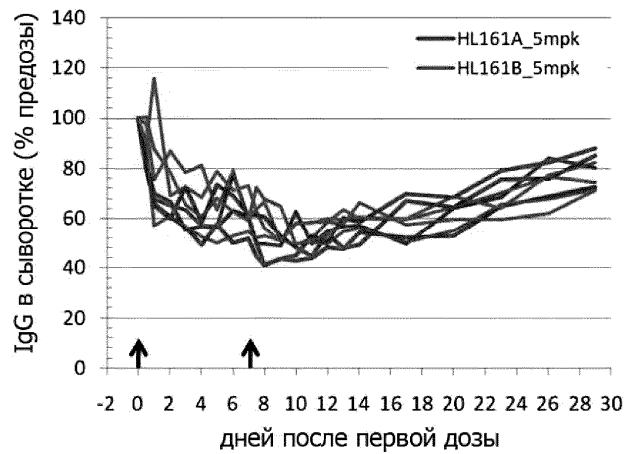




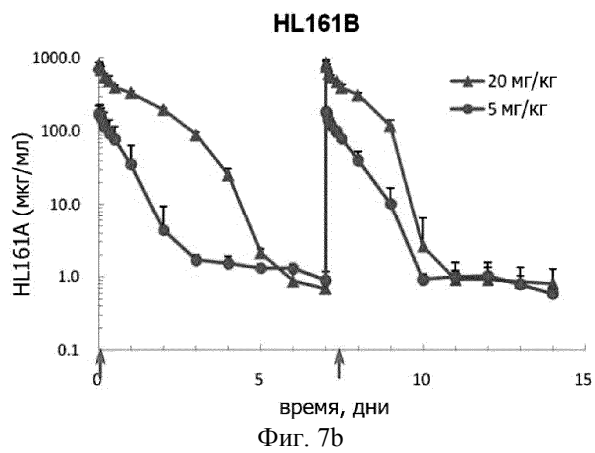
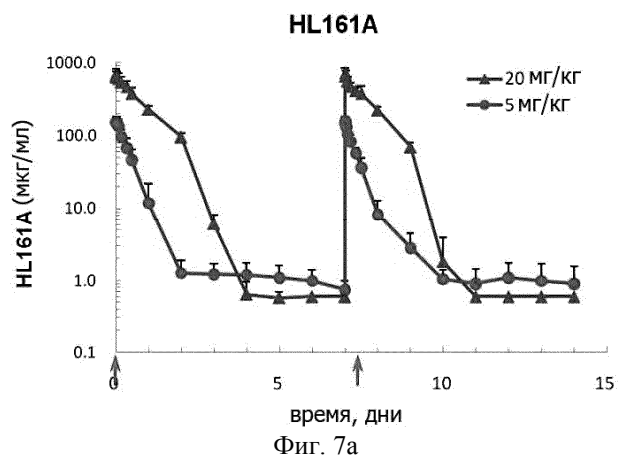
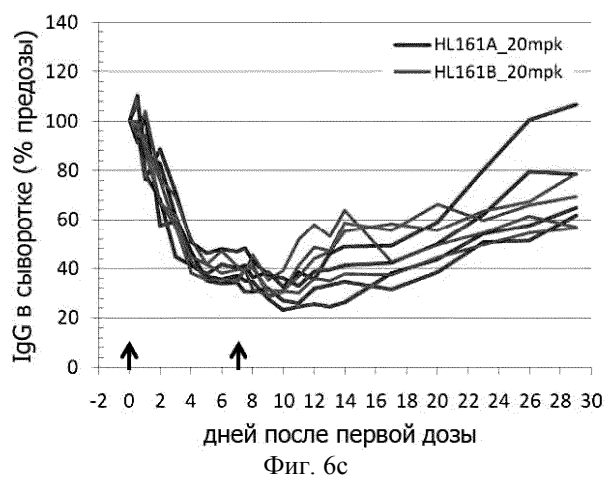
Фиг. 5b

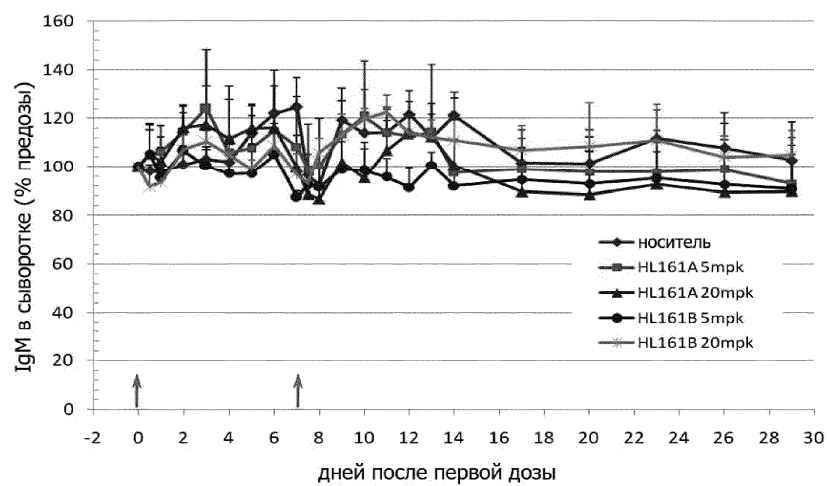


Фиг. 6a

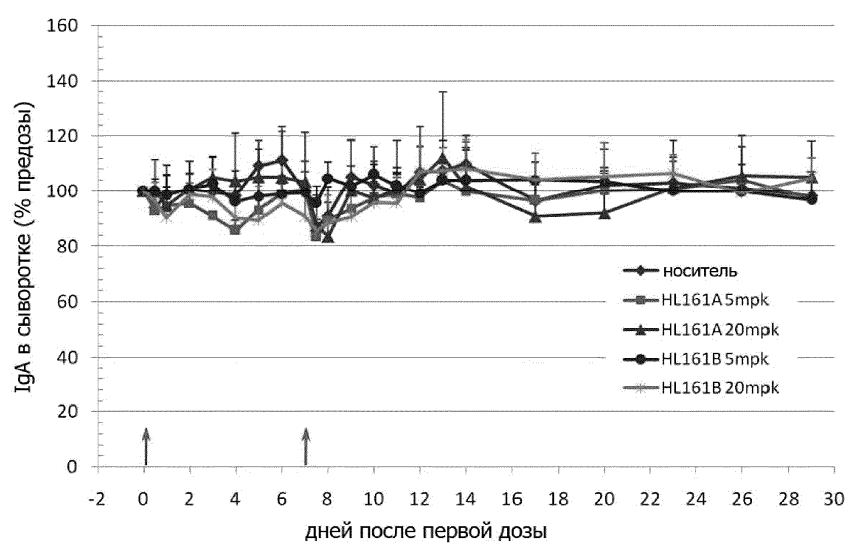


Фиг. 6b

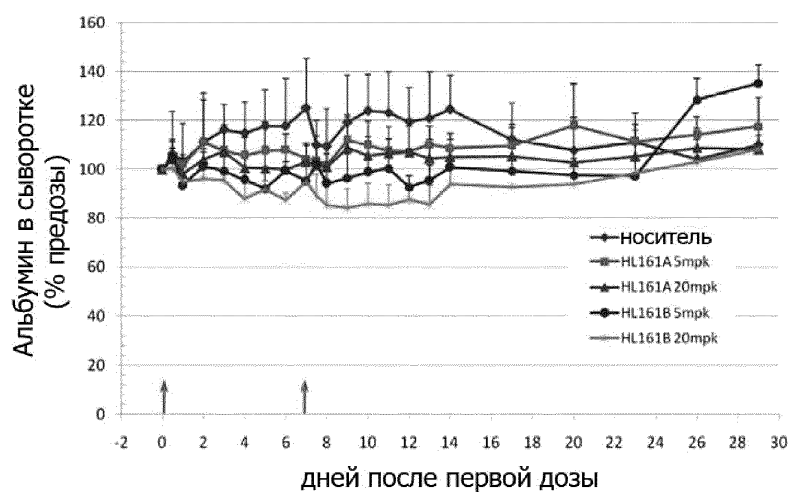




Фиг. 8a



Фиг. 8b



Фиг. 8c

