

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039222**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891048

(22) Дата подачи заявки
2016.10.27

(54) АНТИТЕЛО, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫЙ ВИРУС ЧЕЛОВЕКА

(31) 62/247,841; 62/367,359

(32) 2015.10.29; 2016.07.27

(33) US

(43) 2018.10.31

(86) PCT/US2016/058975

(87) WO 2017/075124 2017.05.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
Вора Калпит А., Кокс Кара С., Танг Аймин, Чен Чжифэн, Дистефано Дэниэл, Чжан Лань, Су Хуа-Поо (US)

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

(56) WO-A2-2006050280
WO-A1-9711177

MCKAY BROWN ET AL.: "Tolerance to single, but not multiple, amino acid replacements in antibody V-H CDR2: A means of minimizing B cell wastage from somatic hypermutation?", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 156, no. 9, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 3285-3291, XP002649029, ISSN: 0022-1767, the whole document, in particular abstract

(57) Изобретение относится к моноклональным антителам, имеющим высокие титры при нейтрализации РСВ. Изобретение также относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела по изобретению, и клеткам-хозяевам, трансформированным ими. Кроме того, изобретение относится к диагностическим, профилактическим и терапевтическим способам с использованием антител и нуклеиновых кислот по изобретению, в частности, в качестве пассивного иммунотерапевтического средства для детей и пожилых людей.

B1

039222

039222

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к человеческим моноклональным антителам, имеющим высокие титры при нейтрализации РСВ, а также к применению этих антител в качестве пассивного иммунотерапевтического средства для детей и пожилых людей.

Предпосылки к созданию изобретения

Парамиксовирусы представляют собой оболочечные, содержащие негативную РНК вирусы, являющиеся опасными патогенами человека и животных. Респираторно-синцитиальный вирус человека (чРСВ, РСВ) принадлежит к семейству Paramyxoviridae, подсемейству Pneumovirinae. Идентифицировано два подтипа вируса, тип А и тип В, являющиеся основной причиной тяжелых, и иногда даже смертельных, респираторных инфекций у детей в возрасте менее 6 месяцев. Взрослые люди с первичными заболеваниями, такими как ХОБЛ, астма, рак, с состоянием иммунодефицита, включая ВИЧ-инфекцию или состояние после трансплантации, также имеют риск развития тяжелой РСВ инфекции. РСВ является причиной 15% ежегодных госпитализаций взрослых людей в возрасте старше 50 лет из-за острой респираторной инфекции. В США РСВ является причиной более 100000 госпитализаций ежегодно и, по оценкам, ежегодно приводит примерно к 160000 смертельным случаям во всем мире. В настоящее время не существует вакцины против РСВ, и испытание с использованием инактивированного формалином вируса было связано с возрастанием тяжести заболевания у детей после инфицирования РСВ. Другие представители семейства, включая метапневмовирус человека (чМПВ) и вирус парагриппа человека (чПГВ), также вызывают острые респираторные заболевания, аналогично чРСВ.

Геном чРСВ представляет собой одноцепочечную отрицательно-полярную молекулу РНК размером примерно 15 т.н., которая кодирует 11 белков. Два из этих белков являются основными поверхностными гликопротеинами вириона. Они представляют собой:

- (i) белок прикрепления (G), который опосредует прикрепление вируса к клеткам; и
- (ii) белок слияния (F), который стимулирует как слияние вирусной и клеточной мембран на начальных стадиях инфекционного цикла, так и слияние мембран инфицированных клеток с мембранами соседних клеток, с образованием характерного синцития.

G-белок прикрепления связывается с рецепторами клеточной поверхности и взаимодействует с F-белком. Это взаимодействие запускает процесс конформационного изменения F-белка, индуцирующий слияние мембран, в результате чего вирусный рибонуклеиновый комплекс высвобождается в цитоплазму клетки-хозяина.

Показано, что моноклональные антитела к F-белку или G-белку оказывают нейтрализующий эффект *in vitro* и профилактическое действие *in vivo*. См., например, Beeler and Coelingh, 1989, J. Virol. 63:2941-50; Garcia-Barreno et al., 1989, J. Virol. 63:925-32; Taylor et al., 1984, Immunology, 52:137-142; Walsh et al., 1984, Infection and Immunity, 43:756-758 и патенты США № 5842307 и 6818216. Эпитопы для нейтрализующих антител на F-гликопротеине исходно были картированы путем идентификации аминокислот, которые были изменены в вариантах, не подверженных действию антител, а также путем оценки связывания антител с пептидами, полученными из F-белка РСВ. Эти исследования показали, что нейтрализующие антитела часто направлены на два разных линейных эпитопа. См. Graham et al., 2015, Curr. Opin. Immunol. 35:30-38 для обзора антигенных сайтов форм "до слияния" и "после слияния" F-белка. Антигенный сайт II (также называемый сайтом А) содержит остатки 255-275 и является мишенью для паливизумаба (синагис®, AstraZeneca). Было предсказано, что этот эпитоп является зависимым от конформации, и структура более эффективного производного паливизумаба в комплексе с этим эпитопом позволила установить, что линейный эпитоп принимает конформацию типа спираль-петля-спираль. Антигенный сайт IV (также называемый сайтом С) содержит остатки 422-438 и является мишенью антител mAt 19 и 101F. Данный эпитоп является С-концевым по отношению к богатой цистеином области и является частью домена II, который в гомологичных F-гликопротеинах парамиксовирусов имеет неизменную структуру в конформациях до и после слияния. Антитела 5C4, AM22 и D25 позволили определить границы эпитопа, обозначенного "сайт 0", который присутствует только в форме "до слияния" F-белка, и были в 50 раз более эффективными, чем паливизумаб. См. McLellan et al., 2013, Science, 340:1113-1117; международную патентную заявку № WO 2008/147196 и патент США № 8568726. Другие антитела против чРСВ описаны в международных патентных заявках № WO 94/06448 и WO 92/04381 и патенте США № 8221759.

Вакцина против РСВ для активной иммунизации, в случае ее наличия, не может быть использована для лечения новорожденных детей с незрелой иммунной системой или пациентов, иммунная система которых подавлена. Для пациентов, которым необходима профилактическая пассивная иммунотерапия вследствие более хронической формы заболевания, современный метод лечения заключается в периодических внутривенных введениях человеческих IgG, полученных из объединенной плазмы. При такой терапии из-за низких титров нейтрализующих анти-РСВ антител необходимо введение большого количества глобулина (например, 0,75 г на 1 кг массы тела) и постоянно требуется внутривенное введение в условиях клиники или больницы, продолжающееся длительное время (2-4 ч), которое выполняют ежемесячно в периоды высокого риска (осень, зима и ранняя весна).

ния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET). В конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или варибельная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET).

В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с F-белком РСВ человека, которое содержит (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с варибельной областью тяжелой цепи, состоящей из SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с варибельной областью легкой цепи, состоящей из SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или варибельная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В этих вышеупомянутых вариантах осуществления вариации последовательности имеют место в каркасных областях. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET). В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В другом варианте осуществления изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с РСВ человека, которое содержит (i) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или варибельная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет 1, 2 или 3 аминокислотные замены в областях CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1-3) и/или в областях CDR легкой цепи

(SEQ ID NO: 4-6). Последовательность VH SEQ ID NO: 7 содержит области CDR SEQ ID NO: 1-3; и последовательность VL SEQ ID NO: 8 содержит области CDR SEQ ID NO: 4-6. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ).

В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с F-белком РСВ человека. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с F-белком РСВ человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно, имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с тем же эпитопом F-белка РСВ человека, что и антитело, содержащее тяжелую цепь SEQ ID NO: 23 и легкую цепь SEQ ID NO: 25, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ). В одном варианте осуществления антитело имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи и/или вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и/или вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или вариабельная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое перекрестно блокирует связывание (или является конкурентом) антитела, содержащего тяжелую цепь SEQ ID NO: 23 и легкую цепь SEQ ID NO: 25, с РСВ человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OСТЕТ). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 или вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен в вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 или вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет

1, 2 или 3 аминокислотные замены в областях CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1-3) и/или в областях CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 4-6). В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с F-белком PCB человека, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или ее вариант, имеющий вплоть до 30 аминокислотных замен, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, имеющую вплоть до 12 аминокислотных замен. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с F-белком PCB человека, при этом антитело связывается с F-белком PCB человека за счет одного или более из следующих взаимодействий или всех из следующих взаимодействий:

1) петля CDR3 легкой цепи через остатки Phe 91 и Leu 92 взаимодействует с боковой цепью Arg 429 F-белка PCB человека путем образования двух водородных связей между атомами кислорода карбонильных групп Phe 91 и Leu 92 в петле CDR3 и атомами азота гуанидиновых групп Arg 429 F-белка PCB человека;

2) петля CDR2 легкой цепи через остатки Asp 50 и Glu 55 образует водородные связи с Asn 426 и Lys 445 F-белка PCB человека;

3) петля CDR3 тяжелой цепи через остатки Tyr 104 и Tyr 110 образует поверхность для ван-дер-ваальсовых взаимодействий с Ile 432 на F-белке PCB человека;

4) петля CDR3 тяжелой цепи через Asn 107 образует водородную связь с Lys 433 F-белка PCB человека; и

5) легкая цепь укладывается напротив Glu 161 и Ser 182 соседнего мономера тримера "до слияния" PCB.

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является выделенным.

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой рекомбинантное антитело.

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело.

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, состоящую из (а) любой из переменных областей тяжелой цепи, описанных выше, и (б) лидерного пептида (например, лидерного пептида SEQ ID NO: 10). В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может содержать переменную область легкой цепи, состоящую из (а) любой из переменных областей, описанных выше, и (б) лидерного пептида (например, лидерного пептида SEQ ID NO: 10).

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой антитело, содержащее любую из переменных областей тяжелой цепи, описанных выше, и любой константный домен тяжелой цепи антитела человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению относится к изотипу IgG и содержит константный домен тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека, при этом константный домен IgG1 является афукозилированным.

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может содержать любую из переменных областей легкой цепи, описанных выше, и константный домен легкой цепи антитела человека. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен легкой цепи каппа антитела человека или его вариант, при этом вариант имеет до 20, 10, 5, 3, 2 или 1 аминокислотных замен. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен легкой цепи ламбда антитела человека или его вариант, при этом вариант имеет до 20, 10, 5, 3, 2 или 1 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит константный домен легкой цепи каппа антитела человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления антитело к F-белку чPCB по изобретению имеет полную тетрамерную структуру с двумя легкими цепями и двумя тяжелыми цепями, при этом каждая легкая цепь содержит переменную область, содержащую SEQ ID NO: 8, и константный домен легкой цепи каппа антитела человека (SEQ ID NO: 14); и каждая тяжелая цепь содержит переменную область, содержащую

SEQ ID NO: 7, и константный домен IgG1 человека (SEQ ID NO: 13).

В конкретных аспектах любого из вышеуказанных вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению может быть конъюгировано по меньшей мере с одним профилактическим или терапевтическим средством. В одном варианте осуществления терапевтическое средство представляет собой втрое антитело или его фрагмент, иммуномодулятор, гормон, цитотоксическое средство, фермент, радиоактивный изотоп, второе антитело, конъюгированное по меньшей мере с одним иммуномодулятором, ферментом, радиоактивной меткой, гормоном, антисмысловым олигонуклеотидом или цитотоксическим средством либо их сочетание.

Изобретение также относится к выделенным полипептидам, содержащим любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1-8, 23 или 25 или фрагмент любой из указанных последовательностей. В конкретных вариантах осуществления полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи, не содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Изобретение также относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов, к F-белку чPCB по изобретению. В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из полипептидов SEQ ID NO: 1-8, 23 или 25, при этом указанные полипептиды могут, необязательно, содержать лидерную последовательность. В конкретных вариантах осуществления полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи, не содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Изобретение также относится к экспрессионным векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из полипептидов SEQ ID NO: 1-8, 23 или 25 (при этом указанные полипептиды могут, необязательно, содержать лидерную последовательность). В конкретных вариантах осуществления полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи, не содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Эти выделенные нуклеиновые кислоты и экспрессионные векторы, содержащие их, могут быть использованы для экспрессии антител по изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов в рекомбинантных клетках-хозяевах. Таким образом, изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов SEQ ID NO: 1-8, 23 или 25 (при этом указанные полипептиды могут, необязательно, содержать лидерную последовательность). В конкретных вариантах осуществления полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи, не содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомяка. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку, например клетку *Pichia* или клетку-хозяина *Pichia pastoris*.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель представляет собой L-гистидин. В одном аспекте данного варианта осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент сформулировано в растворе 10 мМ L-гистидина, 7% (мас./об.) сахарозы и 0,02% (мас./об.) полисорбата-80, pH 6,0. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как правило, присутствует в таком препарате в концентрации примерно 100 мг/мл.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и содержащим дополнительное профилактическое или терапевтическое средство. В одном варианте осуществления дополнительное профилактическое или терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из второго анти-чPCB антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления второе анти-чPCB антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или вариательная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Изобретение также относится к емкости или инъекционному устройству, содержащему любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов к F-белку чPCB по изобретению. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению содержит (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариательной области легкой це-

пи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

Изобретение также относится к способу получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента к F-белку чPCB по изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела по изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент), в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и, необязательно, извлечение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или культуральной среды. В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, находятся в одном векторе. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, находятся в разных векторах. В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержащее (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

Изобретение также относится к способу профилактики или лечения чPCB инфекции у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента к F-белку чPCB по изобретению, необязательно, в комбинации с дополнительным профилактическим или терапевтическим средством либо терапевтической процедурой. В одном варианте осуществления пациент, получающий лечение, является человеком. В одном варианте осуществления дополнительное профилактическое или терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из второго анти-чPCB антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент к F-белку PCB, или конъюгата антитела. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению содержит (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

Изобретение также относится к способу предотвращения или лечения чPCB инфекции у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента к F-белку чPCB по изобретению, необязательно, в комбинации с дополнительным профилактическим или терапевтическим средством либо терапевтической процедурой. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению содержит (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 переменной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

Изобретение также относится к вакцине или иммуногенной композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению содержит (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или вариательная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В одном варианте осуществления вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит антиген, выбранный из F-белка PCB и G-белка PCB, а также их фрагментов.

Изобретение также относится к способу обнаружения присутствия PCB в образце (путем обнаружения F-белка или его фрагмента), включающему создание контакта образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению и обнаружение присутствия комплекса между антителом или фрагментом и пептидом; при этом обнаружение комплекса указывает на присутствие F-белка PCB. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит (i) CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (ii) CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (iii) CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (iv) CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (v) CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (vi) CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или вариательная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

Изобретение также относится к способу повышения анти-чPCB активности антитела к F-белку чPCB, включающему получение исходного антитела к F-белку чPCB и усиление эффекторной функции исходного антитела к F-белку чPCB; при этом активность полученного антитела к F-белку чPCB повышена по сравнению с активностью исходного антитела к F-белку чPCB. Используемый в настоящем описании термин "исходное антитело" относится к антителу, имеющему Fc-область дикого типа и/или гликозилирование дикого типа (т.е. паттерн гликозилирования, возникающий в результате экспрессии полипептида в генетически не модифицированной клетке-хозяине млекопитающего). Эффекторная функция исходного антитела может быть усилена за счет мутаций его Fc-области или за счет изменения его паттерна гликозилирования, например, путем создания афукозилированного антитела (как описано более подробно ниже). В одном варианте осуществления эффекторную функцию исходного антитела к F-белку чPCB усиливают путем введения мутаций в Fc-область исходного антитела к F-белку чPCB. В другом варианте осуществления эффекторную функцию исходного антитела к F-белку чPCB усиливают за счет удаления остатков фукозы из антитела либо за счет экспрессии антитела в клетке-хозяине, генетически модифицированной для устранения активности фермента, обеспечивающего добавление остатков фукозы в гликопротеины.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А, 1В представлены кривые связывания (анализ ELISA) антител против PCB человека: D25, паливизумаба и RB1 с формами "до слияния" (А) и "после слияния" (В) F-белка PCB человека.

На фиг. 2А, 2В представлены кривые нейтрализации для антител против PCB человека в случае PCB А штамма Long (А) и PCB В штамма Washington (В).

На фиг. 3А, 3В показано картирование эпитопа для RB1 методом аланин-сканирующего мутагенеза F-белка слияния (А) и остатки картированного эпитопа на кристаллической структуре формы "до слияния" F-белка (В).

На фиг. 4А-4D показана эффективность RB1 в сравнении с D25 в легких хлопкового хомяка в модели заражения PCB А в зависимости от концентраций антитела (А) и в модели заражения PCB В в зависимости от концентраций антитела (В) или количество вирусных частиц (БОЕ/г), присутствующих в тканях, в зависимости от дозы антитела при заражении PCB А (С) и заражении PCB В (D).

На фиг. 5А-5D показана эффективность RB1 в сравнении с D25 в носу хлопкового хомяка в модели заражения PCB А в зависимости от концентраций антитела (А) и в модели заражения PCB В в зависимости от концентраций антитела (В) или количество вирусных частиц (БОЕ/г), присутствующих в тканях, в

зависимости от дозы антитела при заражении РСВ А (С) и заражении РСВ В (D).

На фиг. 6 приведена кривая связывания (анализ ELISA) антитела RB1+YTE против РСВ человека с F-белком РСВ А человека.

На фиг. 7 показаны фармакокинетические свойства у макак-резусов антитела RB1-YTE (RB1+YTE) в сравнении с мотаивизумабом, имеющим набор мутаций YTE.

Подробное описание изобретения

Сокращения.

В тексте подробного описания и примеров изобретения использованы следующие сокращения:

ADCC	Антителозависимая клеточная цитотоксичность
CDC	Комплементзависимая цитотоксичность
CDR	Определяющая комплементарность область в переменных областях иммуноглобулина, определенная с использованием системы нумерации Kabat
CHO	Яичник китайского хомяка
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
FR	Каркасная область антитела: переменные области иммуноглобулина за исключением областей CDR
HRP	Пероксидаза хрена
IC50	Концентрация, приводящая к 50% ингибированию
IgG	Имуноглобулин G
Kabat	Система выравнивания и нумерации остатков иммуноглобулинов, впервые предложенная Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)
MAb или Mat или МАТ	Моноклональное антитело
V-область	Сегмент цепей IgG, последовательность которого варьирует у разных антител. Он продолжается до остатка 109 в легкой цепи и остатка 113 в тяжелой цепи по системе Kabat.
VH	Переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина
VK	Переменная область легкой цепи каппа иммуноглобулина

Определения.

Для облегчения понимания изобретения ниже приведено разъяснение некоторых технических и научных терминов. Если в настоящем описании специально не указано иное, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится это изобретение.

При использовании в настоящем описании, включая прилагаемую формулу изобретения, термины в единственном числе включают соответствующие термины во множественном числе, если из контекста четко не следует иное.

Термины "введение" и "воздействие" применительно к животному, человеку, экспериментальному пациенту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости означают создание контакта экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического средства или композиции с животным, человеком, пациентом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Воздействие на клетку включает создание контакта реагента с клеткой, а также создание контакта реагента с жидкостью, когда жидкость находится в контакте с клеткой. Термины "введение" и "воздействие" также означают *in vitro* и *ex vivo* воздействие, например, на клетку реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой.

"РСВ заболевание" означает любое заболевание, вызываемое, прямо или косвенно, инфицированием респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), а также заболевания или состояния, которые предрасполагают пациента к инфицированию РСВ. Примеры заболеваний, попадающих в указанную категорию, включают пневмонию и бронхолит. Заболевания и состояния в указанной категории (т.е. те, которые являются причиной возникновения риска тяжелой РСВ инфекции у пациента) включают кистозный фиброз, врожденное заболевание сердца, рак, возрастную иммуносупрессию, получение трансплантата и, в

целом, любое состояние, вызывающее иммуносупрессию или снижение функции иммунной системы, такое как состояние после операции по трансплантации органа или преждевременных родов.

Термины "лечить" или "лечение" означают введение терапевтического средства, такого как композиция, содержащая любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, внутренним или внешним путем введения лицу или пациенту, имеющему один или более симптомов заболевания или предположительно имеющему заболевание, в отношении которого средство обладает терапевтической активностью. Как правило, средство вводят в количестве, эффективном для ослабления одного или более симптомов заболевания у получающего лечение пациента или группы пациентов, за счет либо вызывания регрессии, либо ингибирования прогрессирования такого симптома(ов) до какой-либо клинически измеримой степени. Количество терапевтического средства, которое эффективно для ослабления какого-либо конкретного симптома заболевания, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст и масса тела пациента, а также способность лекарственного средства вызывать желательный ответ у пациента. Произошло ли ослабление симптома, можно оценивать путем измерений любых клинических показателей, как правило, используемых врачами или другим квалифицированным медицинским персоналом для оценки степени тяжести или состояния прогрессирования симптома. Лечение анти-PCB антителами также можно сочетать с другими видами вмешательства (использованием антител, нуклеиновых кислот, вакцин и низкомолекулярных соединений) для лечения вызываемых патогенами респираторных заболеваний.

Термины "предотвращать" или "предотвращение" означают введение профилактического средства, такого как композиция, содержащая любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, внутренним или внешним путем введения пациенту или пациенту, имеющему риск инфицирования чPCB, в отношении которого средство обладает профилактической активностью. Предотвращение включает уменьшение вероятности или степени тяжести последующей РСВ инфекции, облегчение симптомов, связанных с инфекцией нижних дыхательных путей (ИНДП), при инфицировании РСВ, а также вызывание иммунитета для защиты от РСВ инфекции. Как правило, средство вводят в количестве, эффективном для нейтрализации РСВ в легких и/или в носу с целью блокирования инфекции. Количество профилактического средства, которое эффективно для ослабления какого-либо конкретного симптома заболевания, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как возраст и масса тела пациента, а также способность средства вызывать желательный ответ у пациента. Произошло ли ослабление симптома заболевания, можно оценивать путем измерений любых клинических показателей, как правило, используемых врачами или другим квалифицированным медицинским персоналом для оценки степени тяжести или состояния прогрессирования симптома, или в некоторых случаях на основании уменьшения необходимости в госпитализации.

F-белок чPCB.

F-белок РСВ человека синтезируется в виде метастабильного тримерного предшественника (F0), который протеолитически расщепляется на ковалентно связанные субъединицы F1 и F2. Атомные структуры тримеров F-белка в форме "до слияния" были определены для представителей ПГВ-5 и РСВ семейства парамиксовирусов. См. McLellan et al., 2011, *J. Virol.* 85:7788-7796 (PCB) и Welch et al., 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:16672-16677 (ПГВ). Форма "до слияния" F-белка имеет короткий С-концевой цитоплазматический фрагмент, один трансмембранный домен, спиральный стебель и шаровидный головной домен. Атомные структуры F-белков ВБН, чПГВ-3 и РСВ в форме "после слияния" показали, что происходит большое событие рефолдинга для преобразования формы "до слияния" в форму "после слияния" F-белка, при котором происходит перегруппировка части шаровидного головного домена, с образованием шестиспирального пучка. Эти структуры, наряду с данными по пептидному ингибированию, позволили создать модель опосредованного F-белком слияния мембран, в которой при активации происходит перегруппировка F1/F2, с введением гидрофобного пептида слияния из N-конца F1 в мембрану клетки-мишени, что приводит к образованию предварительной шпильчатой промежуточной структуры. Эта относительно вытянутая структура связывает вирус с клеточной мембраной и разрушается, образуя стабильный шестиспиральный пучок структуры "после слияния". Переход от метастабильной формы "до слияния" к предварительной шпильчатой промежуточной структуре, а затем к конформации "после слияния" происходит в направлении уменьшения свободной энергии, при этом форма "после слияния" является наиболее стабильным состоянием, и энергия, высвобождаемая в процессе рефолдинга F-белка, затрачивается на слияние мембран.

Термин "F-белок чPCB" включает F-белок РСВ человека, а также его фрагменты, такие как его зрелый фрагмент без сигнального пептида. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность F-белка РСВ человека представляет собой аминокислотную последовательность, приведенную в Genbank под регистрационным номером AAR14266 (чPCB В штамма 9320).

Анти-чPCB антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, связывающим F-белок РСВ человека, предпочтительно из РСВ как А, так и В штаммов, которые связывают как форму "до слияния" F-белка, так и форму "после слияния" F-белка, и к вариантам применения таких антител или фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антитела к F-белку РСВ являются выде-

ленными. Антитела, описанные в настоящем документе, связываются с эпитопом в сайте IV F-белка. В любом из конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и/или легкая цепь или переменная область легкой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и легкая цепь содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В предпочтительных вариантах осуществления антитела к F-белку РСВ являются полностью человеческими. Основное преимущество моноклональных антител по изобретению является следствием того факта, что они содержат последовательности CDR3 антитела человека и в некоторых вариантах осуществления могут представлять собой полностью человеческие моноклональные антитела. Таким образом, *in vivo* применение полностью человеческих моноклональных антител по изобретению для иммунопрофилактики и иммунотерапии РСВ заболевания сильно уменьшает проблему иммунного ответа хозяина на пассивно введенные антитела. Такая проблема обычно имеет место при использовании моноклональных антител предшествующего уровня техники, имеющих ксеногенное или химерное происхождение. Вторым важным аспектом данного преимущества является потенциальная безопасность данных человеческих моноклональных антител для генно-терапевтических вариантов применения, в которых экспрессия ксеногенных или химерных белков, содержащих последовательности, не принадлежащие человеку, не может быть прекращена.

Используемый в настоящем описании термин "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку РСВ" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с F-белком РСВ человека. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое "специфически связывается с РСВ человека" представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с формой "до слияния" или формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d примерно 1 нМ или с более высокой аффинностью (например, 1 нМ - 2 пМ, 1 нМ, 100, 10 или 2 пМ), но не связывается с другими белками, лишенными последовательностей F-белка РСВ. В одном варианте осуществления антитело по изобретению, которое специфически связывается с F-белком РСВ человека, также перекрестно реагирует с F-белком РСВ крупного рогатого скота. Используемый в настоящем описании термин "перекрестная реактивность" означает способность антитела взаимодействовать с гомологичным белком из других биологических видов. Связывается ли антитело специфически с F-белком РСВ человека, можно определять с использованием любого анализа, известного в данной области. Примеры анализов, известных в данной области, для определения аффинности связывания включают анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OSET).

Настоящее изобретение включает антитела к F-белку чРСВ и способы их применения. Используемый в настоящем описании термин "антитело" относится к любой форме антитела, обладающей желательной биологической активностью. Таким образом, он используется в самом широком смысле и, в частности, включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела, содержащие две легкие цепи и две тяжелые цепи), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела и химерные антитела.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие фрагменты к F-белку чРСВ и способы их применения. При использовании в настоящем описании, если нет иных указаний, термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" означают антигенсвязывающие фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном, который связывает полноразмерное антитело, например фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, например, scFv; а также мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Настоящее изобретение включает Fab-фрагменты к F-белку РСВ и способы их применения. "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи, а также CH1 и переменных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Fab-фрагмент" может представлять собой продукт расщепления антитела папаином.

Настоящее изобретение включает антитела к F-белку РСВ и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие Fc-область, а также способы их применения. "Fc"-область содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие CH1 и CH2 домены антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями CH3 доменов.

Настоящее изобретение включает Fab'-фрагменты к F-белку РСВ и способы их применения. "Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и часть или фрагмент одной тяжелой цепи, содержащий VH домен и CH1 домен, а также область между CH1 и CH2 доменами так, что может быть образована межцепочечная дисульфидная связь между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов с образованием молекулы F(ab')₂.

Настоящее изобретение включает $F(ab')_2$ -фрагменты к F-белку РСВ и способы их применения. " $F(ab')_2$ -фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между CH1 и CH2 доменами, так, что образуется межцепочечная дисульфидная связь между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, $F(ab')_2$ -фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями. " $F(ab')_2$ -фрагмент" может быть продуктом расщепления антитела пепсином.

Настоящее изобретение включает Fv-фрагменты к F-белку РСВ и способы их применения. "Fv-область" содержит переменные области как тяжелых, так и легких цепей, но не содержит константные области.

Настоящее изобретение включает scFv-фрагменты к F-белку РСВ и способы их применения. Термин "одноцепочечные Fv", или "scFv", антитела означает фрагменты антитела, содержащие VH и VL домены антитела, причем эти домены находятся на одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH и VL доменами, который позволяет scFv образовывать структуру, необходимую для связывания антигена. Для обзора, посвященного scFv, см. Pluckthun (1994), *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, p. 269-315. См. также публикацию международной патентной заявки WO 88/01649 и патенты США № 4946778 и 5260203.

Настоящее изобретение включает доменные антитела к F-белку РСВ и способы их применения. "Доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более VH областей ковалентно связаны пептидным линкером, образуя двухвалентное доменное антитело. Две VH области двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на одинаковые или разные антигены.

Настоящее изобретение включает двухвалентные антитела к F-белку РСВ и способы их применения. "Двухвалентное антитело" содержит два антигенсвязывающих сайта. В некоторых случаях два связывающих сайта имеют одну и ту же антигенную специфичность. Однако двухвалентные антитела могут быть биспецифическими (см. ниже).

Настоящее изобретение включает диатела к F-белку РСВ и способы их применения. Используемый в настоящем описании термин "диатела" означает небольшие фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, при этом фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL или VL-VH). В результате использования линкера, который является слишком коротким, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынужденно образуют пары с комплементарными доменами другой цепи, с образованием двух антигенсвязывающих сайтов. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097, WO 93/11161 и Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448. Для обзора, посвященного рекомбинантным вариантам антител, в основном см. Holliger and Hudson (2005), *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

Как правило, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, которое некоторым образом модифицировано, сохраняет по меньшей мере 10% от его активности связывания (в сравнении с исходным антителом), в молярном выражении. Предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению сохраняет по меньшей мере 20, 50, 70, 80, 90, 95 или 100% или более аффинности связывания для F-белка РСВ от аффинности исходного антитела. Также предусмотрено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может иметь консервативные или не консервативные аминокислотные замены (такие варианты называют "консервативные варианты" или "функционально консервативные варианты" антитела), которые существенно не изменяют его биологическую активность.

Настоящее изобретение включает выделенные антитела к F-белку чРСВ и их антигенсвязывающие фрагменты, а также способы их применения. "Выделенные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты являются по меньшей мере частично свободными от других биологических молекул из клеток или клеточных культур, в которых они продуцируются. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как клеточный детрит и ростовая среда. Кроме того, выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть по меньшей мере частично свободным от компонентов системы экспрессии, таких как биологические молекулы из их клетки-хозяина или ростовая среда. Как правило, термин "выделенные" не должен означать полное отсутствие таких биологических молекул или отсутствие воды, буферов или солей или компонентов фармацевтического препарата, содержащего антитело или фрагменты.

Настоящее изобретение включает моноклональные антитела к F-белку чРСВ и их антигенсвязывающие фрагменты, а также композиции моноклональных антител, содержащие несколько выделенных моноклональных антител. Используемый в настоящем описании термин "моноклональное антитело" относится к популяции практически гомогенных антител, т.е. молекулы антитела, составляющие популяцию, являются идентичными по аминокислотной последовательности, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, обычные

(поликлональные) препараты антител, как правило, содержат множество разных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в их вариабельных доменах, в частности их областях CDR, которые часто бывают специфичными для разных эпитопов. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, как полученного из практически гомогенной популяции антител, и не должно предполагать необходимость получения антитела конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567).

Как правило, структурная единица основного (или "полноразмерного") антитела представляет собой тетрамер. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара содержит одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" (примерно 50-70 кДа) цепь. Амино-концевая часть каждой цепи содержит вариабельную область, или домен, примерно из 100-110 или более аминокислот, играющую основную роль в узнавании антигена. Карбокси-концевая часть тяжелой цепи может содержать константную область, или домен, играющую основную роль в эффекторной функции. Как правило, легкие цепи антитела человека классифицируют как легкие цепи каппа и ламбда. Кроме того, тяжелые цепи антитела человека, как правило, классифицируют как цепи мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В составе легких и тяжелых цепей вариабельные и константные области связаны "J"-областью из примерно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит "D"-область еще из примерно 10 аминокислот. См. в основном *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd Ed., Raven Press, N.Y. (1989)). В контексте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента термины "домен" и "область" могут быть использованы взаимозаменяемо, когда это целесообразно.

Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепей образуют связывающий сайт антитела. Таким образом, как правило, интактное антитело имеет два связывающих сайта. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два связывающих сайта являются, как правило, одинаковыми.

Как правило, вариабельные домены тяжелой и легкой цепей содержат три гипервариабельные области, также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), находящиеся среди относительно консервативных каркасных областей (FR). Области CDR, как правило, расположены в ряд с каркасными областями, что создает возможность для связывания конкретного эпитопа. Как правило, от N-конца к C-концу вариабельные домены как легкой, так и тяжелой цепей содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Обычно аминокислоты относят к каждому домену в соответствии с определениями, приведенными в публикациях *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Rabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th Ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Rabat, 1978, *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Rabat, et al., 1977, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia et al., 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 или Chothia et al., 1989, *Nature*, 342:878-883.

Используемый в настоящем описании термин "гипервариабельная область" означает аминокислотные остатки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (т.е. CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в вариабельном домене легкой цепи и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в вариабельном домене тяжелой цепи). См. Rabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела на основании последовательности); см. также Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (определение областей CDR антитела на основании структуры). Используемый в настоящем описании термин "каркасные" или "FR" остатки означает остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельных областей, определенных в настоящем описании, как остатки CDR.

Термины "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" или "выделенный полинуклеотид" означают полинуклеотид ДНК или РНК геномного, мРНК, кДНК или синтетического происхождения, или некоторые их сочетания, который не связан с полноразмерным, или частичным, полинуклеотидом, в котором выделенный полинуклеотид встречается в природе или связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе. Для целей этого изобретения следует понимать, что термин "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не охватывает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" конкретные нуклеотидные последовательности, могут содержать, в дополнение к указанным последовательностям, кодирующие последовательности до десяти или даже до двадцати или более других белков либо их частей или фрагментов, или могут содержать функционально связанные регуляторные последовательности, контролирующие экспрессию кодирующей области указанных нуклеотидных последовательностей, и/или могут содержать векторные последовательности.

Термин "последовательности контроля" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Последовательности контроля, которые являются подходящими для прокариот, например, включают последовательность промотора, необязательно оператора, и сайт связывания рибосомы. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования и энхан-

серы.

Нуклеиновая кислота, или полинуклеотид, является "функционально связанной", когда она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК для предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК для полипептида, если она экспрессируется в виде пребелка, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы способствовать трансляции. Как правило, но не всегда, термин "функционально связанные" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторной лидерной последовательности, являются смежными и в фазе считывания. Однако энхансеры необязательно должны быть смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в удобные сайты рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

Используемые в настоящем описании термины "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо, и все такие определения включают клеточное потомство. Таким образом, термины "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную указанную клетку и культуры, полученные из нее, без учета количества пересевов. Следует также понимать, что не все потомки будут иметь абсолютно идентичную ДНК вследствие преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Мутантное потомство, имеющее такую же функцию или биологическую активность, на которую был проведен скрининг исходной трансформированной клетки, охвачено данными терминами. Там, где предполагаются четкие обозначения, это будет ясно из контекста.

Используемый в настоящем описании термин "последовательность зародышевой линии" относится к последовательности не перегруппированных последовательностей ДНК иммуноглобулина. Можно использовать любой подходящий источник не перегруппированных последовательностей иммуноглобулина.

Последовательности зародышевой линии белков человека можно получать, например, из баз данных последовательностей зародышевой линии JOINSOLVER на веб-сайте Национального института артрита и скелетно-мышечных и кожных болезней Национальных институтов здоровья США. Последовательности зародышевой линии белков мыши можно получать, например, как описано в статье Giudicelli et al., 2005, *Nucleic Acids Res.* 33:D256-D261.

Физические и функциональные свойства иллюстративных антител к F-белку РСВ.

Настоящее изобретение относится к антителам к F-белку чРСВ и их антигенсвязывающим фрагментам, имеющим указанные структурные и функциональные свойства, а также к способам применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов в лечении или предотвращении заболеваний/состояний, связанных с РСВ инфекцией.

"Антитело к F-белку РСВ или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению" включает любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в настоящем документе (например, RB1), или его вариант (например, с вариантной последовательностью или функциональный вариант); любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее любую одну или более из областей CDR, приведенных в табл. 7; любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тем же эпитопом в F-белке РСВ человека, что и антитела, описанные в настоящем документе (например, RB1); и любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое перекрестно блокирует (частично или полностью) антитело или перекрестно блокируется (частично или полностью) антителом, описанным в настоящем документе (например, RB1), при связывании с РСВ.

Перекрестно блокирующие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы на основании их способности перекрестно конкурировать с антителом по изобретению в стандартных анализах связывания (таких как *Viacore*, ELISA, проточная цитометрия). Например, можно использовать стандартные анализы ELISA, в которых рекомбинантный F-белок РСВ иммобилизуют на планшете, одно из антител флуоресцентно метят и оценивают способность немеченного антитела конкурировать за связывание с меченым антителом. Дополнительно или альтернативно, можно использовать анализ *Viacore* для оценки способности антитела перекрестно конкурировать. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание другого антитела (например, антитела D25) с F-белком РСВ показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с другим антителом (например, D25) за связывание с F-белком РСВ, и, таким образом, в некоторых случаях может связывать тот же эпитоп на F-белке РСВ, что и антитело D25, или перекрывающийся эпитоп.

Как указано выше, антитела и их фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов к F-белку РСВ по настоящему изобретению, также являются частью настоящего изобретения. Кроме того, в конкретных вариантах осуществления антитела, которые связываются с эпитопом, перекрывающимся с эпитопом, связываемым любым из антител к F-белку РСВ по изобретению, также являются частью настоящего изобретения. Известно несколько методов картирования эпитопов антитела на антигенах-мишенях, включая ВДО масс-спектрометрию, рентгеновскую кристаллографию, анализ *pepscan* и сайт-направленный мутагенез. Например, ВДО (водород-

но-дейтериевый обмен) в сочетании с протеолизом и масс-спектрометрией можно использовать для определения эпитопов антитела на специфическом антигене Y. Метод ВДО-МС основан на точном измерении и сравнении степени включения дейтерия антигеном при инкубации в D₂O в отсутствие и в присутствии антитела к нему через разные временные интервалы. Дейтерий обменивается с водородом на амидном каркасе белков в открытых областях, в то время как области связывания антигена с антителом будут защищены и будут демонстрировать меньшую степень или отсутствие обмена после анализа методом ЖХ-МС/МС протеолитических фрагментов.

Примеры иммуноглобулиновых цепей антител к F-белку РСВ по изобретению, а также их областей CDR включают, но не ограничиваются ими, те, которые приведены в табл. 7 (SEQ ID NO: 1-8, 23 и 25). Настоящее изобретение включает любой полипептид, содержащий, состоящий по существу из, или состоящий из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-8, 23 и 25, а также рекомбинантные нуклеотиды, кодирующие такие полипептиды.

В объем настоящего изобретения входят выделенные антитела к F-белку чРСВ и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариант иммуноглобулиновой цепи, приведенной в настоящем описании, например, любой из SEQ ID NO: 7, 8; при этом вариант проявляет одно или более из следующих свойств: (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET). В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает F-белок РСВ человека и содержит VL домены и VH домены, имеющие по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 (VL) и 7 (VH); при этом вариант проявляет желательное связывание и свойства, например, (i) связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET) или (ii) связывается с формой "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной Kd от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-11} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET). В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Термины "консервативно модифицированные варианты" или "консервативная замена" относятся к заменам аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими аналогичные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость каркаса и т.д.), так что изменения часто могут быть произведены без изменения биологической активности белка. Специалисты в данной области понимают, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида не приводят к значительным изменениям биологической активности (см., например, Watson et al. (1987), *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замены на структурно или функционально аналогичные аминокислоты с меньшей вероятностью приводят к нарушению биологической активности. Иллюстративные консервативные замены приведены в табл. 1.

Таблица 1

Иллюстративные консервативные аминокислотные замены

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Функционально консервативные варианты антител по изобретению также предусмотрены по настоящему изобретению. Используемый в настоящем описании термин "функционально консервативные варианты" относится к антителам или их фрагментам, в которых один или более аминокислотных остатков были заменены без изменения желаемого свойства, такого как аффинность и/или специфичность в отношении антигена. Такие варианты включают, но не ограничиваются ими, варианты с заменой аминокислоты на аминокислоту, имеющую аналогичные свойства, например, варианты с консервативными аминокислотными заменами, приведенными в табл. 1. Также предложены выделенные полипептиды, содержащие VL домены антител к F-белку чPCB по изобретению (например, SEQ ID NO: 8), и выделенные полипептиды, содержащие VH домены (например, SEQ ID NO: 7) антител к F-белку чPCB по изобретению, имеющие вплоть до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных замен, которые могут иметь место исключительно в каркасной области или из которых одна или более могут находиться в одной или более из областей CDR. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В другом варианте осуществления предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает F-белок чPCB и содержит VL домены и VH домены, имеющие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80 или 75% идентичности последовательности с одним или более из VL доменов или VH доменов, описанных в настоящем документе, и демонстрирует специфическое связывание с F-белком чPCB. В другом варианте осуществления связывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит VL и VH домены (с сигнальной последовательностью или без нее), имеющие вплоть до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных замен, которые могут иметь место исключительно в каркасной области или из которых одна или более могут находиться в одной или более из областей CDR и демонстрирует специфическое связывание с F-белком чPCB. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или переменная область тяжелой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Полинуклеотиды и полипептиды.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим любые из полипептидов или иммуноглобулиновых цепей антител и их антигенсвязывающих фрагментов к F-белку чPCB по изобретению. В одном варианте осуществления выделенный полинуклеотид кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее по меньшей мере один зрелый переменный домен легкой цепи иммуноглобулина (VL) по изобретению и/или по меньшей мере один зрелый переменный домен

тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) по изобретению. В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует как легкую цепь, так и тяжелую цепь на одной полинуклеотидной молекуле, и в других вариантах осуществления легкая и тяжелая цепи закодированы на отдельных полинуклеотидных молекулах. В другом варианте осуществления полинуклеотид также кодирует сигнальную последовательность. Например, настоящее изобретение включает полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-8, 23 и 25, а также полинуклеотиды, которые гибридизуются с ними, и, кроме того, любой полипептид, закодированный таким гибридизующимся полинуклеотидом. В одном варианте осуществления изобретение относится к нуклеотидной последовательности, содержащей, состоящей по существу из, или состоящей из SEQ ID NO: 15 (вариабельная область тяжелой цепи) или SEQ ID NO: 16 (вариабельная область легкой цепи). В конкретных вариантах осуществления можно использовать кодон-оптимизацию для усиления свойств нуклеиновой кислоты, например экспрессии в определенном хозяине. В одном варианте осуществления изобретение относится к нуклеотидной последовательности, содержащей, состоящей по существу из, или состоящей из SEQ ID NO: 17 (кодон-оптимизированная вариабельная область тяжелой цепи) или SEQ ID NO: 18 (кодон-оптимизированная вариабельная область легкой цепи). В конкретных вариантах осуществления можно использовать лидерную последовательность. В одном варианте осуществления изобретение относится к нуклеотидной последовательности, содержащей, состоящей по существу из, или состоящей из SEQ ID NO: 19 (лидерная последовательность и тяжелая цепь) или SEQ ID NO: 20 (лидерная последовательность и легкая цепь), связанных с тяжелой цепью или легкой цепью, с образованием SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22 соответственно.

Как правило, полинуклеотиды гибридизуются в условиях низкой, средней или высокой строгости и кодируют антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые сохраняют способность к связыванию F-белка чPCB. Первая полинуклеотидная молекула является "гибридируемой" со второй полинуклеотидной молекулой, если одноцепочечная форма первой полинуклеотидной молекулы может отжигаться со второй полинуклеотидной молекулой в соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора (см. Sambrook, et al., выше). Температура и ионная сила определяют "строгость" условий гибридизации. Типичные условия гибридизации низкой строгости включают 55°C, 5X SSC, 0,1% SDS и отсутствие формамида или 30% формамида с 5X SSC, 0,5% SDS при 42°C. Типичные условия гибридизации средней строгости включают 40% формамида с 5X или 6X SSC и 0,1% SDS при 42°C. Условия гибридизации высокой строгости включают 50% формамида с 5X или 6X SSC при 42°C или, необязательно, при более высокой температуре (например, 57, 59, 60, 62, 63, 65 или 68°C). Как правило, SSC представляет собой раствор 0,15 M NaCl и 0,015 M Na-цитрата. Для гибридизации необходимо, чтобы два полинуклеотида содержали комплементарные последовательности, хотя, в зависимости от строгости условий гибридизации, возможны несовпадения между основаниями. Подходящая строгость условий для гибридизующихся полинуклеотидов зависит от длины полинуклеотидов и степени комплементарности, переменных величин, хорошо известных в данной области. Чем больше степень сходства или гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, тем выше строгость условий, при которых нуклеиновые кислоты могут гибридизоваться. Для гибридов длиной более 100 нуклеотидов были разработаны формулы для расчета температуры плавления (см. Sambrook et al., выше, 9.50-9.51). В случае гибридизации с более короткими полинуклеотидами, например олигонуклеотидами, количество несовпадающих положений становится более важным, и длина олигонуклеотида определяет его специфичность (см. Sambrook, et al., выше, 11.7-11.8).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащий CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2) и CDR-H3 (SEQ ID NO: 3).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащий CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5) и CDR-L3 (SEQ ID NO: 6).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела SEQ ID NO: 7 или тяжелую цепь SEQ ID NO: 23.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела SEQ ID NO: 8 или легкую цепь SEQ ID NO: 25.

Настоящее изобретение также относится к векторам, например экспрессионным векторам, таким как плазмиды, содержащим выделенные полинуклеотиды по изобретению, при этом полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля, которые узнаются клеткой-хозяином, когда клетку-хозяина трансфицируют вектором. Также предложены клетки-хозяева, содержащие вектор по настоящему изобретению, и способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, раскрытых в настоящем описании, включающие культивирование клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор или нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулиновые цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в культуральной среде и выделение антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина или культуральной среды.

Настоящее изобретение также включает полипептиды, например полипептиды иммуноглобулина, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 75% идентичны, на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 90% идентичны и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 95% идентичны (например, 95, 96, 97, 98, 99, 100%) с аминокислотными последовательностями антител, приведенными в настоящем описании, при сравнении с использованием алгоритма BLAST, когда параметры алгоритма выбраны для достижения наибольшего соответствия между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, порог ожидания: 10; размер слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; матрица BLOSUM 62; штрафы за делецию: внесение 11, продолжение 1; условная композиционная корректировка матрицы замен).

"Идентичность последовательностей" означает степень, в которой аминокислоты двух полипептидов являются одинаковыми в эквивалентных положениях при оптимальном выравнивании двух последовательностей.

Следующие литературные источники посвящены описанию алгоритмов BLAST, часто используемых для анализа последовательностей:

BLAST ALGORITHMS: Altschul et al. (2005), FEBS J. 272(20):5101-5109; Altschul, S.F., et al., (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410;

Gish, W., et al., (1993), Nature, Genet. 3:266-272; Madden, T.L., et al., (1996), Meth. Enzymol. 266:131-141;

Altschul, S.F., et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et al., (1997), Genome Res. 7:649-656;

Wootton, J.C., et al., (1993), Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. et al., (1994), Comput. Appl. Biosci. 10:67-70;

ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., et al., "A model of evolutionary change in proteins", в Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978), vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), p. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC;

Schwartz, R.M., et al., "Matrices for detecting distant relationships", в Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978), vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), p. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991), J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., et al., (1991), Methods. 3:66-70;

Henikoff, S., et al., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919; Altschul, S.F., et al., (1993), J. Mol. Evol. 36:290-300;

ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268;

Karlin, S., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877;

Dembo, A., et al., (1994), Ann. Prob. 22:2022-2039 и

Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments", в Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997), p. 1-14, Plenum, New York.

Аффинность связывания.

В качестве примера, но не ограничения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут связывать форму "до слияния" F-белка или форму "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_D по меньшей мере примерно 1×10^{-9} М (т.е. величиной K_D 1×10^{-9} М или ниже) при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или ОСТЕТ). В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут связывать форму "до слияния" F-белка или форму "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_D по меньшей мере от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или ОСТЕТ). В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут связывать форму "до слияния" F-белка или форму "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_D от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или ОСТЕТ). В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут связывать форму "до слияния" F-белка или форму "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_D по меньшей мере примерно 100 пМ (т.е. величиной K_D примерно 100 пМ или ниже) при определении методом Biacore или аналогичным методом. В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут связывать форму "до слияния" F-белка или форму "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_D по меньшей мере примерно 10 пМ (т.е. величиной K_D примерно 10 пМ или ниже) при определении методом Biacore или аналогичным методом. В одном варианте осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут связывать форму "до слияния" F-белка или форму "после слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_D от примерно 1 до примерно 100 пМ при определении методом Biacore или аналогичным

методом.

Способы получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

Настоящее изобретение относится к способам получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к F-белку чРСВ по настоящему изобретению, включающему культивирование линии клеток, экспрессирующих антитело или фрагмент, в условиях, благоприятных для такой экспрессии, и, необязательно, выделение антитела или фрагмента из клеток и/или ростовой среды (например, среды для культивирования клеток).

Антитела к F-белку чРСВ, раскрытые в настоящем описании, также можно получать рекомбинантными методами (например, в экспрессионной системе *E. coli*/T7, экспрессионной системе клеток млекопитающих или экспрессионной системе низших эукариот). В данном варианте осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы антитела по изобретению (например, VH или VL), могут быть вставлены в плазмиду на основе pET и экспрессированы в системе *E. coli*/T7. Например, настоящее изобретение включает способы экспрессии антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его иммуноглобулиновой цепи в клетке-хозяине (например, бактериальной клетке-хозяине, такой как *E. coli*, например, BL21 или BL21DE3), включающие экспрессию T7 РНК-полимеразы в клетке, которая также содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновую цепь, которая функционально связана с промотором T7. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения бактериальная клетка-хозяин, такая как *E. coli*, содержит полинуклеотид, кодирующий T7 РНК-полимеразу, функционально связанный с lac-промотором, и экспрессия полимеразы и цепи индуцируется путем инкубации клетки-хозяина с IPTG (изопропил-бета-D-тиогактопиранозид).

В данной области известно несколько методов получения рекомбинантных антител. Один пример метода получения рекомбинантных антител приведен в патенте США № 4816567.

Трансформацию можно выполнять любым известным методом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Методы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядро. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области, см., например, патенты США № 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455.

Таким образом, настоящее изобретение включает рекомбинантные способы получения анти-чРСВ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его иммуноглобулиновой цепи по настоящему изобретению, включающие введение полинуклеотида, кодирующего одну или более иммуноглобулиновых цепей антитела или фрагмента (например, тяжелую и/или легкую иммуноглобулиновую цепь); культивирование клетки-хозяина (например, CHO или *Pichia*, или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для такой экспрессии, и, необязательно, выделение антитела или фрагмента или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин.

Антитела к F-белку чРСВ также можно синтезировать любым из методов, изложенных в патенте США № 6331415.

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, включая клетки млекопитающих, в качестве хозяев для экспрессии антител или фрагментов или иммуноглобулиновых цепей, раскрытых в настоящем описании, хорошо известны в данной области и включают многие иммортализованные линии клеток, доступные от Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, в частности, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, HepG2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и целый ряд других линий клеток. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные линии клеток выбирают, определяя линии клеток с высокими уровнями экспрессии. Другие линии клеток, которые можно использовать, включают линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9, клетки амфибий, клетки бактерий, клетки растений и клетки грибов. Клетки грибов включают клетки дрожжей и клетки нитчатых грибов, в том числе, например, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*, *Pichia sp.*, любые *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, любые *Kluyveromyces sp.*, *Candida albicans*, любые *Aspergillus sp.*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, любые *Fusarium sp.*, *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие тяжелую либо ее антигенсвязывающую часть или фрагмент, легкую цепь и/или ее антигенсвязывающий фрагмент, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение перио-

да времени, достаточного для экспрессии антитела или фрагмента или цепи в клетках-хозяевах, либо секретируют их в культуральную среду, в которой растут клетки-хозяева.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и иммуноглобулиновые цепи можно извлекать из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белков. Кроме того, экспрессию антител и их антигенсвязывающих фрагментов и иммуноглобулиновых цепей по изобретению (или других их фрагментов) в линии клеток-продуцентов можно повышать с использованием ряда известных методов. Например, использование экспрессионной системы гена глутаминсинтетазы (система GS) является общепринятым подходом для повышения экспрессии в определенных условиях. Система GS описано полностью или частично в Европейских патентах № 0216846, 0256055 и 0323997 и Европейской патентной заявке № 89303964.4. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения клетки-хозяева млекопитающих (например, CHO) лишены гена глутаминсинтетазы и растут в отсутствие глутамин-аминокислоты в среде, однако при этом полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновую цепь, содержит ген глутаминсинтетазы, который восполняет отсутствие гена в клетке-хозяине.

Настоящее изобретение включает способы очистки анти-чРСВ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающие нанесение образца, содержащего антитело или фрагмент, на среду для очистки (например, среду для катионообменной очистки, среду для анионообменной очистки, среду для гидрофобной очистки, среду для аффинной очистки (например, белок-A, белок-G, белок-A/G, белок-L)) и либо сбор очищенного антитела или фрагмента в проточной фракции указанного образца, которая не связывается со средой; либо отбрасывание проточной фракции и элюцию связавшегося антитела или фрагмента со среды и сбор элюата. В одном из вариантов осуществления изобретения среда находится в колонке, на которую наносят образец. В одном из вариантов осуществления изобретения метод очистки применяют после рекомбинантной экспрессии антитела или фрагмента в клетке-хозяине, например, при этом клетку-хозяина сначала лизируют и, необязательно, лизат очищают от нерастворимых материалов перед очисткой на среде.

Как правило, гликопротеины, продуцируемые в конкретной линии клеток или трансгенном животном, будут иметь паттерн гликозилирования, характерный для гликопротеинов, продуцируемых в линии клеток или трансгенном животном. Таким образом, конкретный паттерн гликозилирования антитела будет зависеть от конкретной линии клеток или трансгенного животного, которые используют для продуцирования антитела. Однако все антитела, закодированные молекулами нуклеиновой кислоты, предложенными в настоящем описании, или содержащие аминокислотные последовательности, предложенные в настоящем описании, включены в настоящее изобретение, независимо от паттерна гликозилирования, который антитела могут иметь. Аналогично, в конкретных вариантах осуществления антитела с паттерном гликозилирования, включающим только не фукозилированные N-гликаны, могут быть предпочтительными, поскольку показано, что такие антитела, как правило, являются более эффективными, чем их фукозилированные аналоги, как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278:3466-3473 (2003); патенты США № 6946292 и 7214775). Данные антитела с не фукозилированными N-гликанами вряд ли будут иммуногенными, поскольку их углеводные структуры являются обычным компонентом популяции, существующей в IgG человеческой сыворотки.

Настоящее изобретение включает биспецифические и бифункциональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие специфичность связывания для F-белка чРСВ и другого антигена, такого как, например, G-белок чРСВ, а также способы их применения. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелой/легкая цепь и два разных сайта связывания. Биспецифические антитела можно получать разными способами, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai, et al., (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny, et al., (1992), J Immunol. 148:1547-1553. Кроме того, биспецифические антитела могут быть получены в виде "диател" (Holliger, et al., (1993), PNAS USA, 90:6444-6448) или в виде "янусинов" (Trauncker, et al., (1991), EMBO J. 10:3655-3659 и Trauncker, et al., (1992), Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52).

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие фрагменты к F-белку чРСВ анти-чРСВ антител, раскрытых в настоящем описании. Фрагменты антитела включают F(ab)₂-фрагменты, которые могут быть получены путем ферментативного расщепления IgG, например, пепсином. Fab-фрагменты могут быть получены, например, путем восстановления F(ab)₂ дитиотреитолом или меркаптоэтиламином.

Имуноглобулины могут быть отнесены к разным классам в зависимости от аминокислотных последовательностей константного домена их тяжелых цепей. Существуют по меньшей мере пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; IgA1 и IgA2. Изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты любого из этих классов или подклассов антител.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, например, человеческую константную область, такую как человеческая константная область тяжелой цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ или $\gamma 4$, или ее вариант. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область легкой цепи, например, челове-

ческую константную область легкой цепи, такую как человеческая константная область легкой цепи лямбда или каппа, или ее вариант. В качестве примера, но не ограничения, человеческая константная область тяжелой цепи может представлять собой γ_4 , и человеческая константная область легкой цепи может представлять собой каппа. В альтернативном варианте осуществления Fc-область антитела представляет собой γ_4 с мутацией Ser228Pro (Schuurman, J. et al., 2001, Mol. Immunol. 38:1-8).

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет константную область тяжелой цепи подтипа IgG1.

В некоторых вариантах осуществления разные константные домены могут быть добавлены к VL и VH областям, образованным с областями CDR, предложенными в настоящем описании. Например, если конкретное запланированное применение антитела (или фрагмента) по настоящему изобретению требует изменения эффекторных функций, то может быть использован константный домен тяжелой цепи, отличный от IgG1 человека, или может быть использован гибрид IgG1/IgG4.

Хотя IgG1 антитела человека отличаются продолжительным временем полужизни и наличием эффекторных функций, таких как активация комплемента и антителозависимая клеточная цитотоксичность, такие активности могут быть нежелательными для некоторых вариантов использования антитела. В таких случаях, например, можно использовать константный домен IgG4 человека. Настоящее изобретение включает антитела к F-белку чPCB и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат константный домен IgG4, например антагонистические гуманизированные антитела к F-белку чPCB и фрагменты, а также способы их применения. В одном варианте осуществления константный домен IgG4 может отличаться от природного константного домена IgG4 человека (Swiss-Prot регистрационный № P01861.1) в положении, соответствующем положению 228 по системе EU и положению 241 по системе KAVAT, где природный остаток Ser108 заменен Pro для предотвращения потенциального образования межцепочечной дисульфидной связи между Cys106 и Cys109 (соответствующими положениям Cys 226 и Cys 229 по системе EU и положениям Cys 239 и Cys 242 по системе Kabat), которая может препятствовать образованию правильной межцепочечной дисульфидной связи. См. Angal et al. (1993), Mol. Immunol. 30:105. В других случаях может быть использован модифицированный константный домен IgG1, который был модифицирован для увеличения времени полужизни или ослабления эффекторной функции.

Конструирование антитела.

Антитела по изобретению можно подвергать мутациям в каркасной области для улучшения свойств антител. Одна такая модификация каркасной области включает мутацию одного или более остатков в каркасной области или даже в одной или более областях CDR для удаления T-клеточных эпитопов с целью уменьшения потенциальной иммуногенности антитела. Такой подход также называют "лишением иммуногенности", он описан более подробно в патенте США № 7125689.

В конкретных вариантах осуществления будет желательной замена некоторых аминокислот, содержащих экспонированные боковые цепи, на другой аминокислотный остаток для обеспечения большей химической стабильности конечного антитела, чтобы избежать дезамидирования или изомеризации. Дезамидирование остатка аспарагина может происходить в последовательностях NG, DG, NG, NS, NA, NT, QG или QS и приводит к созданию остатка изоаспарагиновой кислоты, который вносит изгиб в полипептидную цепь и уменьшает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты). Изомеризация может происходить в последовательностях DG, DS, DA или DT. В конкретных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению не содержат сайтов дезамидирования или аспарагиновой изомеризации.

Например, остаток аспарагина (Asn) может быть заменен на Gln или Ala для уменьшения вероятности образования изоаспартата в любых последовательностях Asn-Gly, особенно в CDR. Аналогичная проблема может возникать в последовательности Asp-Gly. Reissner and Aswad (2003), Cell. Mol. Life Sci. 60:1281. Образование изоаспартата может приводить к ослаблению или полному исчезновению связывания антитела с его целевым антигеном. См., Presta (2005), J. Allergy Clin. Immunol. 116:731-734. В одном варианте осуществления остаток аспарагина заменяют на остаток глутамина (Gln). Также может быть желательной замена аминокислоты, соседней с остатком аспарагина (Asn) или глутамина (Gln), для уменьшения вероятности дезамидирования, которое происходит более часто, когда небольшие аминокислоты находятся рядом с остатком аспарагина или глутамина. См., Bischoff & Kolbe (1994), J. Chromatog. 662:261. Кроме того, любые остатки метионина (как правило, экспонированные для растворителя остатки Met) в областях CDR можно заменять на Lys, Leu, Ala или Phe или другие аминокислоты для уменьшения вероятности того, что сера метионина будет окисляться, что может приводить к уменьшению аффинности связывания антигена и, кроме того, вносить вклад в молекулярную гетерогенность в конечном препарате антитела, та же ссылка. Кроме того, для предотвращения или сведения к минимуму потенциально расщепляемых пептидных связей Asn-Pro может быть желательным изменение любых сочетаний Asn-Pro, обнаруженных в CDR, на Gin-Pro, Ala-Pro или Asn-Ala. Антитела с такими заменами впоследствии подвергают скринингу для подтверждения того, что замены не привели к уменьшению аффинности или специфичности антитела для F-белка чPCB либо другой желательной биологической активности до неприемлемых уровней.

Таблица 2

Иллюстративные стабилизирующие варианты CDR

Остаток CDR	Последовательность стабилизирующего варианта
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly или Asn-Ala (Q-G), (A-G) или (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly или Asp-Ala (E-G), (A-G) или (D-A)
Met (как правило, экспонированный растворителя) (M)	Lys, Leu, Ala или Phe (K), (L), (A) или (F)
Asn (N)	Gln или Ala (Q) или (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro или Asn-Ala (Q-P), (A-P) или (N-A)

Модификация Fc-области антитела.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также могут быть генетически модифицированы для внесения изменений в Fc-область, как правило, для изменения одного или более свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или эффекторная функция (например, антигензависимая клеточная цитотоксичность). Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), могут быть химически модифицированы (например, один или более химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или быть модифицированы для изменения паттерна гликозилирования, опять-таки, для изменения одного или более свойств антитела или фрагмента. Каждый из таких вариантов осуществления описан более подробно ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу Kabat.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также включают антитела и фрагменты с Fc-областями, модифицированными (или блокированными) для изменения эффекторных функций. См., например, патент США № 5624821, WO 2003/086310, WO 2005/120571, WO 2006/0057702. Такие модификации можно использовать для усиления или подавления различных реакций иммунной системы, с возможными полезными эффектами в диагностике и терапии. Изменения Fc-области включают аминокислотные изменения (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование, а также добавление нескольких Fc-областей. Изменения Fc также могут приводить к изменению времени полужизни антител в случае терапевтических антител, что позволяет уменьшать частоту дозирования и, таким образом, повышать удобство и сокращать количество используемого материала. См. Presta, 2005, J. Allergy Clin. Immunol. 116:731, 734-35.

В одном варианте осуществления изобретения шарнирная область CH1 модифицирована так, что число остатков цистеина в шарнирной области увеличено или уменьшено. Такой подход подробно описан в патенте США № 5677425. Число остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей либо для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, RB1) модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно вносить одну из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375. Альтернативно, для увеличения биологического времени полужизни антитело может быть изменено в CH1 или CL области для содержания эпитопа, связывающего рецептор реутилизации, взятого из двух петель CH2 домена Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022. В одном варианте осуществления вводят мутацию M252Y/S254T/T256E (YTE). См., например, Oganessian et al., Mol. Immunol. 2009, 46:1750.

В других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторной функции(ий) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что изменяется аффинность антитела для эффекторного лиганда и сохраняется антигенсвязывающая способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяется, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Такой подход описан более подробно в патентах США № 5624821 и 5648260.

В другом примере одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что изменяется связывание антитела с C1q и/или уменьшается или устраняется комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Такой подход описан более подробно в патенте США № 6194551.

В другом примере один или более аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239 изменяют, чтобы таким образом изменить способность антитела фиксировать комплемент. Такой подход более подробно описан в публикации международной патентной заявки № WO 94/29351.

В другом примере Fc-область модифицируют для уменьшения способности антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению (например, RB1) опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для уменьшения аффинности антитела или фрагмента для Fc γ -рецептора за счет изменения одной или более аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Данный подход более подробно описан в публикации международной патентной заявки № WO 00/42072. Кроме того, сайты связывания на IgG1 человека для Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII и FcRn были картированы, и были описаны варианты, отличающиеся более сильным связыванием (см. Shields et al. (2001), *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604).

В одном варианте осуществления изобретения Fc-область модифицируют для уменьшения способности антитела по изобретению (например, RB1) опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления противовоспалительных свойств за счет модификации остатков 243 и 264. В одном варианте осуществления Fc-область антитела или фрагмента модифицируют путем изменения остатков в положениях 243 и 264 на аланин. В одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для уменьшения способности антитела или фрагмента опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления противовоспалительных свойств за счет модификации остатков 243, 264, 267 и 328.

Усиление эффекторной функции.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область анти-чPCB антитела модифицируют для увеличения способности антитела или антигенсвязывающего фрагмента опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления их связывания с Fc γ -рецепторами (Fc γ R).

Используемый в настоящем описании термин "эффекторная функция" относится к одному или более из антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности (ADCC), комплемент-опосредованной цитотоксической активности (CDC), Fc-опосредованного фагоцитоза или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), а также рециркуляции антитела через FcRn-рецептор.

Считается, что взаимодействие между константной областью антигенсвязывающего белка и различными Fc-рецепторами (FcR), включая Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16), опосредует эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, антигенсвязывающего белка. Fc-рецептор также важен для перекрестного связывания антитела, что может быть важно для противоопухолевого иммунитета.

Эффекторную функцию можно измерять разными способами, в том числе, например, посредством связывания Fc γ RIII с клетками естественными киллерами или посредством связывания Fc γ RI с моноцитами/макрофагами для измерения эффекторной функции ADCC. Например, антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению можно оценивать на эффекторную функцию ADCC в анализе с клетками - естественными киллерами. Примеры таких анализов можно найти в публикациях Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, p. 6591-6604; Chappel et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268:25124-25131; Lazar et al., 2006, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4005-4010.

Свойства ADCC или CDC антител по настоящему изобретению или их способность к перекрестному связыванию можно повышать различными способами.

Показано, что константные области IgG1 человека, имеющие определенные мутации или измененное гликозилирование на остатке Asn297, отличаются более сильным связыванием с Fc-рецепторами. Также показано, что в некоторых случаях данные мутации приводят к усилению ADCC и CDC (Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103:4005-4010; Shields et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276:6591-6604; Nechansky et al., *Mol. Immunol.* 2007, 44:1815-1817).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения такие мутации имеют место в одном или более из положений, выбранных из 239, 332 и 330 (IgG1), или в эквивалентных положениях в IgG других изоформ. Примерами соответствующих мутаций являются S239D, I332E и A330L. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению, описанный в настоящем документе, имеет мутации в положениях 239 и 332, например S239D и I332E, или в следующем варианте осуществления имеет мутации в трех или более положениях, выбранных из 239, 332 и 330, например S239D, I332E и A330L (нумерация по EU-индексу).

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения предложено антитело, содержащее константную область тяжелой цепи с измененным профилем гликозилирования, в результате чего антигенсвязывающий белок имеет усиленную эффекторную функцию. Например, при этом антитело

имеет усиленную ADCC или усиленную CDC или при этом оно имеет обе усиленные эффекторные функции, как ADCC, так и CDC. Примеры соответствующих методологий для получения антигенсвязывающих белков с измененным профилем гликозилирования описаны в публикациях международных патентных заявок № WO 2003011878 и WO 2006014679 и европейской патентной заявке № EP 1229125.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к "не фукозилированным" или "афукозилированным" антителам. Не фукозилированные антитела содержат в Fc-области структуру триманнозного ядра N-гликанов сложного типа без остатков фукозы. Такие антитела с модифицированным паттерном гликозилирования, лишенные остатка фукозы в ядре N-гликанов Fc-области, могут проявлять более сильную ADCC, чем фукозилированные аналоги, из-за усиления способности к связыванию FcγR3a.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела по изобретению, включающему этапы а) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, при этом рекомбинантная клетка-хозяин не содержит альфа-1,6-фукозилтрансферазу; и б) извлечения антигенсвязывающего белка. Рекомбинантная клетка-хозяин может исходно не содержать ген, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу (например, дрожжевые клетки-хозяева, такие как *Pichia* sp.), или может быть генетически модифицирована для инактивации гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы. Рекомбинантные клетки-хозяева, генетически модифицированные для инактивации гена FUT8, кодирующего альфа-1,6-фукозилтрансферазу, доступны. См., например, технологическую систему POTELLIGENT™, предоставляемую компанией BioWa, Inc. (Princeton, N.J.), в которой клетки CHOK1SV, лишенные функциональной копии гена FUT8, продуцируют моноклональные антитела, имеющие повышенную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксическую (ADCC) активность, которая увеличена относительно активности идентичного моноклонального антитела, продуцируемого в клетке с функциональным геном FUT8. Аспекты технологической системы POTELLIGENT™ описаны в патентах США № 7214775, 6946292 и международных патентных заявках № WO 00/61739 и WO 02/31240. Специалистам в данной области известны и другие соответствующие системы.

Специалисты в данной области понимают, что такие модификации могут быть использованы не только отдельно, но могут быть использованы и в сочетании с любыми другими модификациями для дополнительного усиления эффекторной функции.

Получение антител с модифицированным гликозилированием.

В другом варианте осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению (например, RB1) имеют конкретный паттерн гликозилирования. Например, может быть получено афукозилированное или агликозилированное антитело или фрагмент (т.е. антитело, лишенное фукозы или гликозилирования соответственно). Паттерн гликозилирования антитела или фрагмента может быть изменен, например, для повышения аффинности или авидности антитела или фрагмента в отношении антигена F-белка чРСВ. Такие модификации можно осуществлять, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела или фрагмента. Например, можно производить одну или более аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или более сайтов гликозилирования каркаса варибельной области, чтобы устранить гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может приводить к повышению аффинности или авидности антитела или фрагмента для антигена. См., например, патенты США № 5714350 и 6350861.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), могут также включать те, которые получены в клетках-хозяевах низших эукариот, в частности клетках-хозяевах грибов, таких как дрожжи и нитчатые грибы, которые были генетически модифицированы для продуцирования гликопротеинов, имеющих паттерны гликозилирования, характерные для млекопитающих или человека (см., например, Choi et al., (2003), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:5022-5027; Hamilton et al., (2003), Science, 301:1244-1246; Hamilton et al., (2006), Science, 313:1441-1443; Nett et al., (2011), Yeast 28(3):237-52; Hamilton et al., (2007), Curr. Opin. Biotechnol. Oct; 18(5):387-92). Эти генетически модифицированные клетки-хозяева обладают способностью контролировать профиль гликозилирования гликопротеинов, которые продуцируются в клетках, в результате чего могут быть получены композиции гликопротеинов, в которых преобладает конкретная структура N-гликанов (см., например, патенты США № 7029872 и 7449308). Такие генетически модифицированные клетки-хозяева были использованы для продуцирования антител, у которых преобладают конкретные структуры N-гликанов (см., например, Li et al., (2006), Nat. Biotechnol. 24:210-215).

В конкретных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), дополнительно включают те, которые получены в клетках-хозяевах низших эукариот и которые содержат фукозилированные и не фукозилированные гибридные и сложные N-гликаны, в том числе бисектные и полиантенные разновидности, включая, но без ограничения, такие N-гликаны, как $\text{GlcNAc}_{(1-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(1-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(1-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

В конкретных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем описании (например, RB1), могут включать антитела или фрагменты, имеющие по

меньшей мере один гибридный N-гликан, выбранный из группы, состоящей из $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ и $\text{NANAGalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. В конкретных аспектах гибридный N-гликан является преобладающим видом N-гликанов в композиции.

В конкретных вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем описании (например, RB1), включают антитела и фрагменты, имеющие по меньшей мере один сложный N-гликан, выбранный из группы, состоящей из $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. В конкретных аспектах сложный N-гликан является преобладающим видом N-гликанов в композиции. В следующих аспектах сложный N-гликан представляет собой определенный вид N-гликана, составляющий примерно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% от сложных N-гликанов в композиции. В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем описании, содержат сложные N-гликаны, при этом по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% сложных N-гликанов содержат структуру $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, причем такая структура является афукозилированной. Такие структуры могут быть получены, например, в рекомбинантных клетках-хозяевах *Pichia pastoris*.

В конкретных вариантах осуществления N-гликан является фукозилированным. Как правило, фукоза находится в $\alpha 1,3$ -связи с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, $\alpha 1,6$ -связи с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, $\alpha 1,2$ -связи с Gal на невосстанавливающем конце N-гликана, $\alpha 1,3$ -связи с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана или $\alpha 1,4$ -связи с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана.

Таким образом, в конкретных аспектах вышеуказанных композиций гликопротеинов гликоформа включает

$\alpha 1,3$ -связанную или $\alpha 1,6$ -связанную фукозу с образованием гликоформы, выбранной из группы, состоящей из

$\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$;

$\alpha 1,3$ -связанную или $\alpha 1,4$ -связанную фукозу с образованием гликоформы, выбранной из группы, состоящей из

$\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; или $\alpha 1,2$ -связанную фукозу, с образованием гликоформы, выбранной из группы, состоящей из $\text{Gal}(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1,2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

В следующих аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат высокоманнозные N-гликаны, включая, но без ограничения, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, или N-гликаны, состоящие из N-гликановой структуры $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

В следующих аспектах вышеописанные сложные N-гликаны дополнительно включают фукозилированные и не фукозилированные бисектные и полиантенные разновидности.

В настоящем описании термины "N-гликан" и "гликоформа" используются взаимозаменяемо и относятся к N-связанному олигосахариду, например, присоединенному с помощью аспарагин-N-ацетилглюкозаминовой связи к остатку аспарагина полипептида. N-связанные гликопротеины содержат остаток N-ацетилглюкозамина, связанный с атомом азота амидной группы остатка аспарагина в белке. Преобладающими сахарами на гликопротеинах являются глюкоза, галактоза, манноза, фукоза, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и сиаловая кислота (например, N-ацетилнейраминавая кислота (NANA)). Процессинг сахарных групп происходит котрансляционно в просвете ЭР и продолжается посттрансляционно в аппарате Гольджи в случае N-связанных гликопротеинов.

N-гликаны имеют общее пентасахаридное ядро из $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man" означает маннозу; "Glc" означает глюкозу и "NAc" означает N-ацетил; GlcNAc означает N-ацетилглюкозамин). Как правило, N-гликановые структуры представляют с невосстанавливающим концом слева и восстанавливающим концом справа. Восстанавливающий конец N-гликана представляет собой конец, который присоединен к остатку Asp, входящему в сайт гликозилирования на белке. N-гликаны различаются в зависимости от числа ветвей (антенн), содержащих периферические сахара (например, GlcNAc, галактозу, фукозу и сиаловую кислоту), которые дополняют структуру ядра из $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man3"), также называемую "триманнозным ядром", "пентасахаридным ядром" или "пауциманнозным ядром". N-гликаны классифицируются по их разветвленным компонентам (например, высокоманнозные, сложные или гибридные). N-гликан "высокоманнозного" типа имеет пять или более остатков маннозы. N-гликан "сложного" типа, как правило, имеет по меньшей мере один GlcNAc, присоединенный к 1,3-маннозному плечу, и по меньшей мере

один GlcNAc, присоединенный к 1,6-маннозному плечу "триманнозного" ядра. Сложные N-гликаны также могут содержать остатки галактозы ("Gal") или N-ацетилгалактозамина ("GalNAc"), которые, необязательно, модифицированы сиаловой кислотой или производными (например, "NANA" или "NeuAc", где "Neu" означает нейраминную кислоту и "Ac" означает ацетил). Сложные N-гликаны также могут иметь внутрицепочечные замены, включающие "бисектный" GlcNAc и фукозу ядра ("Fuc"). Сложные N-гликаны также могут иметь несколько антенн на "триманнозном ядре", их часто называют "полиантенные гликаны". "Гибридный" N-гликан содержит по меньшей мере один GlcNAc на конце 1,3-маннозного плеча триманнозного ядра и ноль или более остатков маннозы на 1,6-маннозном плече триманнозного ядра. Различные N-гликаны также называют "гликоформами".

Применительно к сложным N-гликанам термины "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" и "A2" означают следующее:

термин "G-2" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$;

термин "G-1" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$;

термин "G0" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$;

термин "G1" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$;

термин "G2" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$;

термин "A1" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{NANA-Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; и

термин "A2" означает N-гликановую структуру, которая может быть охарактеризована как $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

Если нет иных указаний, термины "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" и "A2" означают виды N-гликанов, которые лишены остатков фукозы, присоединенных к остатку GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Если термин включает "F", то "F" указывает на то, что вид N-гликана содержит остаток фукозы на остатке GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Например, все из обозначений G0F, G1F, G2F, A1F и A2F указывают на то, что N-гликан дополнительно содержит остаток фукозы, присоединенный к остатку GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Низшие эукариоты, такие как дрожжи и нитчатые грибы, обычно не продуцируют N-гликаны, содержащие фукозу.

В случае полиантенных N-гликанов термин "полиантенный N-гликан" означает N-гликаны, которые дополнительно содержат остаток GlcNAc на остатке маннозы, входящем в невосстанавливающий конец 1,6-плеча или 1,3-плеча N-гликана, или остаток GlcNAc на каждом из остатков маннозы, входящих в невосстанавливающий конец 1,6-плеча или 1,3-плеча N-гликана. Таким образом, полиантенные N-гликаны могут иметь формулы $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ или $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Термин "1-4" означает 1, 2, 3 или 4 остатка.

В случае бисектных N-гликанов термин "бисектный N-гликан" означает N-гликаны, в которых остаток GlcNAc связан с остатком маннозы на восстанавливающем конце N-гликана. Бисектный N-гликан может иметь формулу $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, где каждый остаток маннозы связан на невосстанавливающем конце с остатком GlcNAc. Напротив, если полиантенный N-гликан имеет формулу $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, формула указывает на то, что два остатка GlcNAc связаны с остатком маннозы на невосстанавливающем конце одного из двух плеч N-гликанов и один остаток GlcNAc связан с остатком маннозы на невосстанавливающем конце другого плеча N-гликана.

Физические свойства антител.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), могут дополнительно содержать один или более сайтов гликозилирования в варибельной области либо легкой, либо тяжелой цепи иммуноглобулина. Некоторые сайты гликозилирования могут приводить к снижению иммуногенности антитела или фрагмента или изменению pK антитела вследствие изменения связывания антигена (Marshall et al., 1972, *Annu Rev. Biochem.* 41:673-702; Gala and Morrison, 2004, *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick et al., 1988, *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro, 2002, *Glycobiology*, 12:43R-56R; Parekh et al., 1985, *Nature*, 316:452-7; Mimura et al., 2000, *Mol. Immunol.* 37:697-706). Известно, что гликозилирование имеет место на фрагментах, содержащих последовательность N-X-S/T.

Каждое антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, RB1) будет иметь уникальную изоэлектрическую точку (pI), которая, как правило, попадает в диапазон pH от 6 до 9,5. Значение pI для IgG1 антитела, как правило, попадает в диапазон pH 7-9,5, и значение pI для IgG4 антитела, как правило, попадает в диапазон pH 6-8.

Каждое антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, RB1) будет иметь характерную температуру плавления, при этом более высокая температура плавления свидетельствует о более высокой общей стабильности *in vivo* (Krishnamurthy R. and Manning M.C. (2002), *Curr Pharm. Biotechnol.* 3:361-71). Как правило, T_{M1} (температура начального разворачивания) может быть более 60°C, более

65°C или более 70°C. Температуру плавления антитела или фрагмента можно измерять методом дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al., (2003), *Pharm. Res.* 20:1952-60; Ghirlando et al., (1999), *Immunol. Lett* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al., (2002), *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

В следующем варианте осуществления выбирают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты (например, RB1), которые не распадаются быстро. Распад антитела или фрагмента можно измерять методом капиллярного электрофореза (КЭ) и МАЛДИ-МС (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995), *Anal. Chem.* 67:3626-32).

В следующем варианте осуществления выбирают антитела (например, RB1) и их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие минимальные эффекты агрегации, которая может приводить к инициации нежелательного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, приемлемыми являются антитела и фрагменты с агрегацией 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, или 5% или менее. Агрегацию можно определять несколькими методами, включая эксклюзионную хроматографию (ЭХ) на колонке, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и рассеяние света.

Конъюгаты антител.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты к F-белку чРСВ, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также могут быть конъюгированы с химическим фрагментом. Химический фрагмент может представлять собой, в частности, полимер, радиоактивный изотоп или цитотоксический фактор. В конкретных вариантах осуществления химический фрагмент представляет собой полимер, который увеличивает время полужизни антитела или фрагмента в организме пациента. Подходящие полимеры включают, без ограничения, гидрофильные полимеры, которые включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ) (например, ПЭГ с молекулярной массой 2, 5, 10, 12, 20, 30 или 40 кДа), декстран и монометоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ). В публикации Lee, et al., (1999), (*Bioconj. Chem.* 10:973-981) описаны конъюгированные с ПЭГ одноцепочечные антитела. В публикации Wen, et al., (2001), (*Bioconj. Chem.* 12:545-553) описана конъюгация антител с ПЭГ, который связан с хелатором радиоактивных металлов (диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТПК)).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также могут быть конъюгированы с метками, такими как ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th и ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tl и ^{56}Fe .

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также могут быть пегилированы, например, для увеличения их биологического времени полужизни (например, в сыворотке). Для пегилирования антитела или фрагмента, как правило, проводят реакцию антитела или фрагмента с реакционноспособной формой полиэтиленгликоля (ПЭГ), такой как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или более групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. В конкретных вариантах осуществления пегилирование осуществляют путем реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем описании термин "полиэтиленгликоль" охватывает любые формы ПЭГ, которые используют для дериватизации других белков, например моно(C₁-C₁₀)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагмент, которое пегилируют, представляет собой агликозилированное антитело или фрагмент. Методы пегилирования белков известны в данной области и могут быть применены к антителам по изобретению. См., например, европейские патентные заявки № EP 0154316 и EP 0401384.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также могут быть конъюгированы с флуоресцентными или хемилюминесцентными метками, включая флуорофоры, например хелаты редкоземельных элементов, флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, изотиоцианат, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталевый альдегид, флуорескамин, ^{152}Eu , дансил, умбеллиферон, люциферин, люминальные метки, изолюминальные метки, метки в виде ароматического сложного эфира акридиния, имидазольные метки, метки в виде соли акридиния, оксалатные сложноэфирные метки, эквориновые метки, 2,3-дигидрофталазиндионы, биотин/авидин, спиновые метки и стабильные свободные радикалы.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению (например, RB1) также могут быть конъюгированы с цитотоксическим фактором, таким как дифтерийный токсин, А-цепь экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки и соединения (например, жирные кислоты) *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки РАРI, РАРII и РАР-S *Phytoiassa americana*, ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, митогеллин, рестриктоцин, феноцидин и эномицин.

Можно использовать любой метод, известный в данной области, для конъюгации антител и их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению (например, RB1) с различными фрагментами, включая методы, описанные в публикациях Hunter et al., 1962, *Nature*, 144:945; David et al., 1974, *Biochemistry*,

13:1014; Pain et al., 1981, J. Immunol. Meth. 40:219 и Nygren, 1982, Histochem. and Cytochem. 30:407. Методы конъюгации антител и фрагментов являются обычными и очень хорошо известны в данной области.

Профилактическое и терапевтическое применение анти-PCSV антител.

Также предложены способы предотвращения, лечения или ослабления симптома РСВ инфекции у пациентов, включая пациентов-людей, которые нуждаются в таком предотвращении, лечении или ослаблении, с использованием выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем описании (например, RB1). В одном варианте осуществления изобретения такой пациент страдает от РСВ инфекции. В другом варианте осуществления изобретения такой пациент имеет риск возникновения РСВ инфекции.

В конкретном варианте осуществления млекопитающему, предпочтительно человеку, вводят профилактическую, терапевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую одно или более антител или их фрагментов по настоящему изобретению для лечения, предотвращения либо ослабления одного или более симптомов, связанных с РСВ инфекцией, в количестве, эффективном для снижения титров РСВ. В соответствии с таким вариантом осуществления эффективное количество антител или фрагментов антител приводит к снижению титров РСВ в легких, что определяют, например, по концентрации РСВ в образцах мокроты или в смывах из легких млекопитающего. В другом варианте осуществления млекопитающему, предпочтительно человеку, вводят профилактическую, терапевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую одно или более антител или их фрагментов по настоящему изобретению для лечения, предотвращения либо ослабления симптомов, связанных с РСВ инфекцией, в количестве, эффективном для нейтрализации РСВ и/или для блокирования РСВ инфекции у млекопитающего.

Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть использованы в качестве иммунотерапии для вызываемых РСВ заболеваний как у людей, так и у других животных. Термины "иммунотерапевтически" или "иммунотерапия", используемые в настоящем описании в связи с моноклональными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами по изобретению, означают профилактическое и терапевтическое введение, пассивную иммунизацию в значительной степени очищенными полипептидными продуктами, а также генную терапию путем переноса полинуклеотидных последовательностей, кодирующих продукт или его часть. Пассивная иммунизация включает перенос активного гуморального иммунитета или введение антител пациенту, который нуждается в этом. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам переноса активного гуморального иммунитета и способам введения анти-PCSV антител или их антигенсвязывающих фрагментов, например IgG антител, пациенту, имеющему риск возникновения РСВ инфекции. Таким образом, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить пациентам, имеющим высокую степень риска, для уменьшения вероятности и/или степени тяжести вызываемого РСВ заболевания либо вводить пациентам, уже имеющим признаки активной РСВ инфекции.

Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с РСВ заболевания у взрослых или детей, в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, включая, но без ограничения, инфекции нижних дыхательных путей, пневмонию, трахеобронхит, бронхолит, бронхит, а также любые связанные инфекции или воспалительные заболевания, например, но без ограничения, по меньшей мере одно из заболеваний или по меньшей мере одно воспаление, связанное с заболеваниями, такими как синдром системного воспалительного ответа, септический синдром, грамположительный сепсис, грамотрицательный сепсис, культурально-негативный сепсис, грибковый сепсис, нейтропеническая лихорадка, уросепсис, менингококкемия, респираторный дистресс-синдром взрослых, аллергический ринит, круглогодичный ринит, астма, системная анафилаксия, реакции рецепторной гиперчувствительности, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), пневмония гиперчувствительности, гранулемы из-за внутриклеточных микроорганизмов, чувствительность к медикаментам, кахексия, кистозный фиброз, неонатальная хроническая болезнь легких; по меньшей мере одно инфекционное заболевание в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, включая, но без ограничения, по меньшей мере одно из острой или хронической бактериальной инфекции, острых и хронических паразитарных или инфекционных процессов, включая бактериальные, вирусные и грибковые инфекции, ВИЧ-инфекции, ВИЧ-невропатии, менингита, гепатита (А, В или С или т.п.), септического артрита, перитонита, пневмонии, эпиглоттита, E. coli 0157:h7, гемолитико-уремического синдрома, тромбоцитопенической пурпуры, малярии, геморрагической лихорадки денге, лейшманиоза, лепры, синдрома токсического шока, стрептококкового миозита, газовой гангрены, микобактериального туберкулеза, инфекции МАИ, пневмоцистной пневмонии, воспалительного заболевания органов малого таза, орхита, эпидидимита, легионеллезной пневмонии, болезни Лайма, гриппа А, вируса Эпштейна-Барр, угрожающего жизни гемофагоцитарного синдрома, угрожающего жизни энцефалита, асептического менингита и тому подобного. Такой способ может, необязательно, включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно анти-PCSV антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, который нуждается в такой модуляции, лечении или терапии.

В одном варианте осуществления профилактические, терапевтические или фармацевтические композиции, содержащие антитела или их фрагменты по изобретению, вводят млекопитающему, предпочтительно человеку, для лечения, предотвращения либо ослабления одного или более симптомов, связанных с РСВ инфекцией. В другом варианте осуществления профилактические, терапевтические или фармацевтические композиции, содержащие антитела или их фрагменты по изобретению, вводят человеку, страдающему кистозным фиброзом, бронхолегочной дисплазией, врожденным заболеванием сердца, врожденным иммунодефицитом или приобретенным иммунодефицитом, или человеку, который получил трансплантат (например, после трансплантации костного мозга, легкого или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК)), для лечения, предотвращения либо ослабления одного или более симптомов, связанных с РСВ инфекцией.

В другом варианте осуществления профилактические, терапевтические или фармацевтические композиции, содержащие антитела или их фрагменты по изобретению, вводят ребенку, предпочтительно недоношенному ребенку или ребенку, имеющему риск госпитализации вследствие РСВ инфекции, для лечения, предотвращения либо ослабления одного или более симптомов, связанных с РСВ инфекцией. В другом варианте осуществления профилактические, терапевтические или фармацевтические композиции, содержащие антитела или их фрагменты по изобретению, вводят пожилым людям или людям в местах общего проживания (например, в домах для престарелых или реабилитационных центрах), либо людям с иммунной недостаточностью.

Предпочтительно использовать высокоаффинные и/или эффективные *in vivo* ингибирующие антитела и/или нейтрализующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с антигеном РСВ, как для предотвращения РСВ инфекции, так и для лечения РСВ инфекции. Также предпочтительно использовать полинуклеотиды, кодирующие высокоаффинные и/или эффективные *in vivo* ингибирующие антитела и/или нейтрализующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с антигеном РСВ, как для предотвращения РСВ инфекции, так и для лечения РСВ инфекции. Такие антитела или их фрагменты предпочтительно будут иметь аффинность в отношении F-гликопротеина и/или фрагментов F-гликопротеина РСВ.

Антитела и функциональные эквиваленты (такие как их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению узнают эпитоп в составе F-белка РСВ. Антитела или их функциональные эквиваленты, которые специфически узнают указанный эпитоп, можно комбинировать с уже известными РСВ-специфичными антителами, которые связываются с другим эпитопом, такими как паливизумаб, D25, AM14, AM16 и AM23. При комбинировании антитела или функционального эквивалента по изобретению, специфически узнающего указанный эпитоп, с известным РСВ-специфичным антителом два или более разных эпитопа РСВ узнаются в процессе одной и той же терапии. В этом случае может быть достигнут более сильный иммунный ответ на РСВ и/или более высокая специфичность антител в отношении РСВ. За счет более сильного иммунного ответа и более высокой специфичности в отношении РСВ такая комбинация может приводить к более эффективному лечению и/или предотвращению связанного с РСВ заболевания.

Одно или более антител по настоящему изобретению или их фрагментов, специфически связывающихся с одним или более антигенами РСВ, можно вводить в организм локально или системно в качестве профилактики. Антитела по данному изобретению или их фрагменты также можно выгодно использовать в сочетании с другими моноклональными или химерными антителами либо с лимфокинами или гемопоэтическими факторами роста (такими как, например, IL-2, IL-3, IL-7 и IL-15), которые, например, служат для увеличения числа или активности эффекторных клеток, взаимодействующих с антителами. Антитела по данному изобретению или их фрагменты также можно выгодно использовать в сочетании с другими моноклональными или химерными антителами либо с лимфокинами или гемопоэтическими факторами роста (такими как, например, IL-2, IL-3 и IL-7), которые, например, служат для усиления иммунного ответа. Антитела по данному изобретению или их фрагменты также можно выгодно использовать в сочетании с одним или более лекарственными средствами, используемыми для лечения РСВ инфекции, такими как, например, противовирусные средства.

Антитела по изобретению или фрагменты можно использовать в сочетании с одним или более из перечисленных лекарственных средств: NIH-351 (Gemini Technologies), рекомбинантная вакцина против РСВ (Aviron), PCBF-2 (Intracel), F-50042 (Pierre Fabre), T-786 (Trimeris), VP-36676 (ViroPharma), RFI-641 (American Home Products), VP-14637 (ViroPharma), PFP-1 и PFP-2 (American Home Products), вакцина против РСВ (Avant Immunotherapeutics) и F-50077 (Pierre Fabre).

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно вводить отдельно или в сочетании с другими видами терапии (например, гормональной терапией, иммунотерапией и терапией противовоспалительными средствами). Как правило, предпочтительным является введение продуктов, происходящих из того же биологического вида или реакционноспособных (в случае антител) в отношении того же биологического вида, что и биологический вид пациента. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления человеческие или гуманизированные антитела, фрагменты, производные, аналоги или нуклеиновые кислоты вводят пациенту-человеку для терапии или профилактики.

"Пациент" может быть млекопитающим, таким как человек, собака, кошка, лошадь, корова, мышь,

крыса, обезьяна (например, яванский макак, например, *Macaca fascicularis*) или кролик. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения пациент является человеком.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), могут быть использованы отдельно или в сочетании с противовирусной терапией.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), могут быть использованы отдельно или в сочетании с другими анти-PCB моноклональными антителами.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), могут быть использованы отдельно или в сочетании с другой анти-PCB вакциной.

Выражение "в сочетании с" указывает на то, что компоненты, вводимые в способ по настоящему изобретению (например, анти-чPCB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, RB1) вместе с, например, паливизумабом), могут быть сформулированы в одной композиции для одновременной доставки или сформулированы раздельно в двух или более композициях (например, в наборе). Каждый компонент можно вводить пациенту в иное время, чем время введения другого компонента; например, каждое введение можно выполнять не одновременно (например, раздельно или последовательно) с некоторыми интервалами на протяжении конкретного периода времени. Кроме того, отдельные компоненты можно вводить пациенту одним и тем же или разными путями введения.

Экспериментальные и диагностические варианты применения.

Антитела к F-белку чPCB и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), можно использовать в качестве аффинных средств для очистки. В данном способе антитела к F-белку чPCB и их антигенсвязывающие фрагменты иммобилизуют на твердой фазе, такой как Sephadex®, стекло, агарозная смола или фильтровальная бумага, методами, хорошо известными в данной области. Иммобилизованное антитело или фрагмент контактирует с образцом, содержащим F-белок чPCB (или его фрагмент), который предстоит очищать, затем подложку промывают соответствующим растворителем, который будет удалять практически весь материал в образце, за исключением F-белка чPCB, связанного с иммобилизованным антителом или фрагментом. В завершение, подложку промывают растворителем, который элюирует связанный F-белок чPCB (например, белком А). Такие иммобилизованные антитела и фрагменты являются частью настоящего изобретения.

Предложены также антигены для получения вторичных антител, полезных, например, для проведения вестерн-блот анализов и других иммуноанализов, описанных в настоящем документе. В частности, раскрыты полипептиды, содержащие последовательности переменных областей и/или областей CDR терапевтического антитела, описанного в настоящем документе (например, RB1), которые могут быть использованы для получения анти-идиотипических антител, используемых для специфического обнаружения присутствия антитела, например, в терапевтическом контексте.

Антитела к F-белку чPCB и их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть полезны в диагностических анализах на F-белок чPCB, например, для обнаружения его экспрессии в определенных клетках, тканях или сыроворотке. Такие диагностические методы могут быть полезны в диагностике различных заболеваний.

Настоящее изобретение включает анализ ELISA (твердофазный иммуоферментный анализ), в котором используют антитело к F-белку чPCB или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытое в настоящем описании (например, RB1).

Например, такой способ включает следующие этапы:

- (a) покрытие субстрата (например, поверхности лунки планшета для микротитрования, например, пластикового планшета) антителом к F-белку чPCB или его антигенсвязывающим фрагментом;
- (b) нанесение образца, тестируемого на присутствие F-белка PCB, на субстрат;
- (c) промывание планшета, при этом несвязанный материал в образце удаляется;
- (d) нанесение меченых детектируемой меткой антител (например, связанных с ферментом антител), которые также специфичны в отношении антигена F-белка PCB;
- (e) промывание субстрата, при этом несвязанные меченые антитела удаляются;
- (f) если меченые антитела связаны с ферментом, наносят химический реагент, который при взаимодействии с ферментом генерирует флуоресцентный сигнал; и
- (g) обнаружение присутствия меченого антитела.

Обнаружение метки, связанной с субстратом, указывает на присутствие F-белка чPCB.

В следующем варианте осуществления меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в качестве метки пероксидазу, которая взаимодействует с ABTS (например, 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислотой)) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидином, при этом происходит изменение окраски, которое поддается обнаружению. Альтернативно, меченое антитело или фрагмент содержит в качестве метки детектируемый радиоизотоп (например, ³H), который можно обнаруживать в сцинтилляционном счетчике в присутствии сцинтиллятора.

Антитело к F-белку чPCB или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, RB1)

можно использовать в методе вестерн-блоттинга или иммунного обнаружения белка на блоте. Такой метод является частью настоящего изобретения и включает, например, этапы:

(1) необязательно, перенесение белков из образца, тестируемого на присутствие F-белка чРСВ (например, после электрофоретического разделения белков образца в ПААГ или SDS-ПААГ), на мембрану или другой твердый субстрат методом, известным в данной области (например, полусухим блоттингом или блоттингом в резервуаре); создание контакта мембраны или другого твердого субстрата, тестируемого на присутствие связанного F-белка чРСВ, или его фрагмента с анти-чРСВ антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению.

Такая мембрана может представлять собой нитроцеллюлозную или виниловую (например, из поливинилиденфторида (ПВДФ)) мембрану, на которую были перенесены белки, тестируемые на присутствие чРСВ, после не денатурирующего электрофореза в ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле) или электрофореза в SDS-ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) (например, после электрофоретического разделения в геле). Перед контактированием мембраны с анти-чРСВ антителом или фрагментом мембрану, необязательно, блокируют, например, раствором обезжиренного сухого молока или т.п. для блокирования сайтов неспецифического связывания белков на мембране.

(2) промывание мембраны один или более раз для удаления несвязанного антитела или фрагмента, к F-белку чРСВ, а также других несвязанных веществ; и

(3) обнаружение связанного антитела или фрагмента к F-белку чРСВ.

Обнаружение связанного антитела или фрагмента указывает на то, что белок чРСВ присутствует на мембране или субстрате и в образце. Обнаруживать связанное антитело или фрагмент можно путем связывания антитела или фрагмента с вторичным антителом (антителом против иммуноглобулинов), меченым детектируемой меткой, с последующим обнаружением присутствия вторичного антитела.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты к F-белку чРСВ, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), также можно использовать для иммуногистохимического анализа. Такой способ является частью настоящего изобретения и включает, например,

(1) создание контакта клетки, тестируемой на присутствие F-белка чРСВ, с антителом к F-белку чРСВ или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и

(2) обнаружение антитела или фрагмента на или в клетке.

Если антитело или фрагмент само мечено детектируемой меткой, его можно обнаруживать непосредственно. Альтернативно, антитело или фрагмент может быть связано меченым детектируемой меткой вторичным антителом, которое обнаруживают.

Фармацевтические композиции и введение.

Для получения фармацевтических или стерильных композиций антител и антигенсвязывающих фрагментов к F-белку чРСВ по изобретению (например, RB1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Препараты терапевтических и диагностических средств можно получать путем смешивания с приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, например, в форме лиофилизированных порошков, густых суспензий, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000), Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY). В одном варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению разбавляют до соответствующей концентрации в 1-20 мМ гистициновом буфере, pH 5-7, и, необязательно, добавляют NaCl или сахарозу (например, 2-15% (мас./об.)) для тоничности. Для повышения стабильности можно добавлять дополнительные средства, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80, в концентрации 0,01-0,10% (мас./об.). Репрезентативный препарат содержит 10 мМ L-гистидин, 7% (мас./об.) сахарозы и 0,02% (мас./об.) полисорбата-80, pH 6,0.

Токсичность и терапевтическую эффективность антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, вводимых отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством, можно определять стандартными фармацевтическими методами с использованием клеточных культур или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Отношение доз для токсического и терапевтического эффектов называют терапевтическим индексом (LD₅₀/ED₅₀). Данные, полученные из этих анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона доз, используемых для человека. Доза таких соединений предпочтительно лежит в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. В этом диапазо-

не дозы могут варьироваться в зависимости от используемой лекарственной формы и пути введения.

Способ введения может варьироваться. Пути введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, кишечный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интраокальный, прямой интравентрикулярный, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляцию, инсуффляцию, топический, кожный, чрескожный или внутриартериальный. Предпочтительными способами введения являются внутримышечный, внутривенный и интраназальный.

В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты к F-белку чРСВ по изобретению (например, RB1) можно вводить инвазивным путем, например инъекцией. В следующих вариантах осуществления изобретения антитело к F-белку чРСВ, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, внутримышечно, внутриартериально, внутрь опухоли либо путем ингаляции, аэрозольной доставки. Введение неинвазивными путями (например, перорально; например, в виде пилюли, капсулы или таблетки) также входит в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к сосуду (например, пластиковому или стеклянному флакону, например, с крышкой или хроматографической колонке, полый игле или цилиндру шприца), содержащему любое из антител, или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению (например, RB1), или его фармацевтическую композицию. Настоящее изобретение также относится к инъекционному устройству, содержащему любое из антител, или антигенсвязывающих фрагментов, по изобретению (например, RB1), или его фармацевтическую композицию. Инъекционное устройство представляет собой устройство, которое вводит вещество в тело пациента парентеральным путем введения, например внутримышечным, подкожным или внутривенным. Например, инъекционное устройство может представлять собой шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, такой как автоматический медицинский шприц), который, например, включает цилиндр или корпус для содержания инъецируемой жидкости (например, антитела, или фрагмента, или его фармацевтической композиции), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости и поршень для выталкивания жидкости из цилиндра через отверстие иглы. В одном из вариантов осуществления изобретения инъекционное устройство, содержащее антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, или его фармацевтическую композицию, представляет собой инъекционное устройство для внутривенного (в/в) введения. Такое устройство содержит антитело, или фрагмент, или его фармацевтическую композицию в канюле или троакаре/игле, которая может быть соединена с трубкой, которая может быть соединена с мешком или резервуаром для содержания жидкости (например, солевого раствора или раствора Рингера лактата, содержащего NaCl, натрия лактат, KCl, CaCl₂ и, необязательно, содержащего глюкозу), вводимой в тело пациента через канюлю или троакар/иглу. Антитело, или фрагмент, или его фармацевтическую композицию, в одном из вариантов осуществления изобретения можно вводить в устройство после того, как троакар и канюля введены в вену пациента и троакар удален из введенной канюли. Устройство для в/в введения можно, например, вводить в периферическую вену (например, в предплечье или плече); верхнюю полую вену или нижнюю полую вену, или в правое предсердие сердца (например, в центральную вену), или в подключичную, внутреннюю яремную или бедренную вену и, например, продвигать в направлении сердца, пока оно не достигнет верхней полых вен или правого предсердия (например, центральной венозной линии). В одном из вариантов осуществления изобретения инъекционное устройство представляет собой автоматический медицинский шприц, безыгольный шприц или внешний инфузионный насос. В безыгольном шприце используется узкая струя жидкости под высоким давлением, которая проникает в эпидермис, доставляя антитело, или фрагмент, или его фармацевтическую композицию в тело пациента. Внешние инфузионные насосы представляют собой медицинские устройства, доставляющие антитело, или фрагмент, или его фармацевтическую композицию в тело пациента в контролируемых количествах. Внешние инфузионные насосы могут быть электрическими или механическими. Разные насосы действуют по-разному, например, шприцевой насос удерживает жидкость в резервуаре шприца, а подвижный поршневой элемент контролирует доставку жидкости, эластомерный насос удерживает жидкость в растяжимом шарообразном резервуаре, и давление от эластичных стенок шара обеспечивает доставку жидкости. В перистальтическом насосе ролики, прокатываясь по гибкой трубке, сдвигают ее, проталкивая жидкость вперед. В многоканальном насосе жидкости могут доставляться из нескольких резервуаров с разными скоростями.

Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, также можно вводить безыгольным устройством для подкожных инъекций, таким, как устройства, описанные в патентах США № 6620135, 6096002, 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Такие безыгольные устройства, содержащие фармацевтическую композицию, также являются частью настоящего изобретения. Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, также можно вводить путем инфузии. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для введения фармацевтических композиций включают те, которые описаны в патенте США № 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для введения медикаментов с контролируемой скоростью; патенте США № 4447233, в котором описан инфузионный насос для доставки медикаментов с точной скоростью инфу-

зии; патенте США № 4447224, в котором описан имплантируемый инфузионный аппарат переменного потока для продолжительной доставки лекарственного средства; патенте США № 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерное строение. Множество других таких имплантатов, систем и модулей для доставки хорошо известны специалистам в данной области, и те, которые содержат фармацевтические композиции по настоящему изобретению, входят в объем настоящего изобретения.

Режим введения зависит от нескольких факторов, включая скорость оборота терапевтического антитела или антигенсвязывающего фрагмента в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность профилактического/терапевтического антитела и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. Предпочтительно режим введения обеспечивает доставку достаточного количества терапевтического антитела или фрагмента для облегчения подвергаемого лечению заболевания, при этом с минимальными нежелательными побочными эффектами. Соответственно, количество доставляемого биологического средства частично зависит от конкретного профилактического/терапевтического антитела и степени тяжести состояния, подвергаемого лечению. Руководство по выбору соответствующих доз терапевтических антител или фрагментов доступно (см., например, Wawrzynczak, (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al., 1999, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al., 2001, *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Соответствующую дозу определяет клиницист, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области для целей предотвращения или лечения заболевания. Как правило, дозирование начинают с количества, которое немного меньше оптимальной дозы, а затем дозу увеличивают с небольшими приращениями до достижения желаемого или оптимального эффекта относительно любых отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические меры включают определение симптомов, например воспаления или уровня продуцирования воспалительных цитокинов. Как правило, желательно, чтобы используемое биологическое средство имело происхождение от того же биологического вида, что и животное, которое предстоит лечить, в этом случае сводится к минимуму любой иммунный ответ на реагент. В случае пациентов-людей, например, может быть желательно использовать гуманизированные и полностью человеческие антитела.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, RB1), можно вводить непрерывной инфузией или дозами, вводя, например, один раз в день, 1-7 раз в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в два месяца, раз в квартал, раз в полгода, раз в год и т.д. Дозы можно вводить, например, внутривенно, подкожно, топически, перорально, назально, ректально, внутримышечно, интрацеребрально, интраспинально или путем ингаляции. Общая недельная доза, как правило, составляет по меньшей мере 0,05 мкг/кг массы тела, чаще по меньшей мере 0,2, 0,5, 1, 10, 100 мкг/кг, 0,25, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 25, 50 мкг/кг или более (см., например, Yang, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, et al., 2002, *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, et al., 1999, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, et al., 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52:151-144). Также можно вводить дозы, позволяющие достигать заранее определенной целевой концентрации анти-чРСВ антитела в сыворотке пациента, например 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 мкг/мл или более. В других вариантах осуществления анти-чРСВ антитело по настоящему изобретению вводят, например, подкожно или внутривенно, раз в неделю, раз в две недели, раз в 4 недели, раз в месяц, раз в два месяца или раз в квартал в дозе 10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 или 2500 мг/пациента.

Используемый в настоящем описании термин "эффективное количество" означает количество анти-чРСВ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению (например, RB1), которое, при введении отдельно или в сочетании с дополнительным терапевтическим/профилактическим средством в клетку, ткань или в тело пациента, является эффективным для нейтрализации РСВ и/или для предотвращения или вызывания измеримого ослабления одного или более симптомов заболевания или состояния, связанного с РСВ инфекцией. "Эффективная доза" также означает количество антитела или фрагмента, достаточное по меньшей мере для частичного предотвращения или ослабления симптомов. В случае, если индивидуальный активный ингредиент вводят отдельно, термин "эффективная доза" относится к данному отдельному ингредиенту. Если ингредиенты используют в сочетании, термин "эффективная доза" относится к суммарному количеству активных ингредиентов, которое приводит к профилактическому или терапевтическому эффекту при введении в сочетании, последовательно или одновременно. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, которое обеспечивает клинически целевую концентрацию в сыворотке 10-30 мкг/мл в течение 5 месяцев. В одном варианте осуществления эффективное количество представляет собой дозу для человека, которая обеспечивает примерную целевую концентрацию 10-30 мкг/мл для достижения эффективности, что определяют при помощи стандартной доклинической модели на хлопковых хомяках.

Наборы.

Также предложены наборы, содержащие один или более компонентов, которые включают, но не ограничиваются ими, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB, описанное в настоящем документе (например, RB1), в сочетании с одним или более дополнительными компонентами, в том числе, но без ограничения, фармацевтически приемлемым носителем и/или профилактическим/терапевтическим средством, описанным в настоящем документе. Антитело, или фрагмент, и/или профилактическое/терапевтическое средство можно формулировать в виде чистой композиции или в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления набор включает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению (например, RB1), или его фармацевтическую композицию в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и фармацевтическую композицию и/или профилактическое/терапевтическое средство в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

В другом варианте осуществления набор содержит комбинацию по изобретению, включающую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чPCB по изобретению (например, RB1) вместе с фармацевтически приемлемым носителем, необязательно, в сочетании с одним или более профилактическими/терапевтическими средствами, сформулированными вместе, необязательно, в фармацевтической композиции в одном общем контейнере.

Если набор включает фармацевтическую композицию для парентерального введения пациенту, набор может включать устройство для выполнения такого введения. Например, набор может включать одну или более игл для подкожных инъекций или другие инъекционные устройства, описанные выше.

Набор может включать вкладыш в упаковку, содержащий информацию о фармацевтических композициях и лекарственных формах в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и врачам использовать входящие в набор фармацевтические композиции и лекарственные формы эффективно и безопасно. Например, вкладыш может содержать следующую информацию о комбинации по изобретению: показатели фармакокинетики и фармакодинамики, результаты клинических исследований, параметры эффективности, показания к применению, противопоказания, предостережения, меры предосторожности, побочные реакции, сведения о передозировке, надлежащие дозы и способ введения, описание поставляемой формы, надлежащие условия хранения, литературные источники, информацию о производителе/дистрибьюторе и патентную информацию.

Наборы для обнаружения и наборы для профилактики/терапии.

Для удобства, анти-чPCB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, RB1) можно предоставлять в наборе, т.е. в виде упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по проведению диагностики или анализа на обнаружение. Если антитело или фрагмент содержит в качестве метки фермент, набор будет включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, создающий поддающийся обнаружению хромофор или флуорофор). Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в широких пределах для создания концентраций реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть предоставлены в виде сухих порошков, как правило, лиофилизованных, включая эксципиенты, которые при растворении образуют раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

Также предложены реагенты для диагностики или обнаружения и наборы, содержащие один или более таких реагентов, для использования в разных обнаруживающих анализах, включая, например, иммуноанализы, такие как ELISA (в формате "сэндвич" или конкурентного анализа). Компоненты набора могут быть заранее связаны с твердой подложкой или могут быть нанесены на поверхность твердой подложки при использовании набора. В некоторых вариантах осуществления изобретения средства для генерирования сигнала могут быть предоставлены предварительно связанными с антителом или фрагментом по изобретению или может потребоваться их объединение с одним или более компонентами, например буферами, конъюгатами антитело-фермент, ферментными субстратами или т.п., перед использованием. Наборы также могут включать дополнительные реагенты, например блокирующие реагенты для уменьшения неспецифического связывания с поверхностью твердой фазы, промывающие реагенты, ферментные субстраты и т.п. Поверхность твердой фазы может иметь форму трубки, гранулы, планшета для микротитрования, микросферы или других материалов, подходящих для иммобилизации белков, пептидов или полипептидов. В конкретных аспектах фермент, катализирующий образование хемилюминесцентного или хромогенного продукта либо восстановление хемилюминесцентного или хромогенного субстрата, является компонентом средства генерирования сигнала. Такие ферменты хорошо известны в данной области. Наборы могут включать любые из захватывающих средств и обнаруживающих реагентов, описанных в настоящем документе. Необязательно, набор также может включать инструкции по осуществлению способов по изобретению.

Также предложен набор, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку

чРСВ, упакованное в контейнере, таком как флакон или бутылка, и дополнительно включающий этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную вместе с ним, на этикетке указано содержание контейнера и приведены предписания и/или инструкции, относящиеся к использованию содержимого контейнера для предотвращения/лечения одного или более болезненных состояний, описанных в настоящем документе.

В одном аспекте набор предназначен для предотвращения или лечения заболеваний/состояний, связанных с РСВ инфекцией и включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чРСВ и дополнительное профилактическое/терапевтическое средство или вакцину. Набор также может, необязательно, включать шприц для парентерального, например внутривенного, введения. В другом аспекте набор включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к F-белку чРСВ и этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную вместе с ним, содержащую информацию об использовании антитела, или фрагмента, вместе с вакциной или дополнительным профилактическим/терапевтическим средством. В другом аспекте набор включает вакцину или дополнительное профилактическое/терапевтическое средство и этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную вместе с ним, содержащую информацию об использовании вакцины или дополнительного профилактического/терапевтического средства вместе с антителом или его фрагментом к F-белку чРСВ. В конкретных вариантах осуществления антитело к F-белку чРСВ и вакцина или дополнительное профилактическое/терапевтическое средство находятся в разных флаконах или объединены в одной и той же фармацевтической композиции.

В случае комбинированной профилактики или терапии для одновременного введения двух профилактических/терапевтических средств необязательно вводить средства в одно и то же время или одним и тем же путем введения при условии, что имеет место перекрывание периодов времени, в течение которых средства оказывают свое профилактическое/терапевтическое действие. Предусмотрено одновременное или последовательное введение, а также введение в разные дни или недели.

Также могут быть изготовлены наборы для профилактики/терапии и обнаружения, раскрытые в настоящем описании, включающие по меньшей мере одно антитело, пептид, антигенсвязывающий фрагмент или полинуклеотид, раскрытые в настоящем описании, и инструкции по использованию композиции в качестве обнаруживающего реагента или профилактического/терапевтического средства. Контейнеры, используемые в таких наборах, как правило, могут представлять собой по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другой подходящий контейнер, в который одна или более из обнаруживающих и/или профилактических/терапевтических композиций могут быть помещены и, предпочтительно, разделены на соответствующие аликвоты. В случае дополнительного предоставления второго профилактического/терапевтического средства набор также может включать второй контейнер, в который может быть помещена вторая обнаруживающая и/или профилактическая/терапевтическая композиция. Альтернативно, несколько соединений могут быть приготовлены в одной фармацевтической композиции и могут быть упакованы в одном контейнере, таком как флакон, колба, шприц, бутылка или другой подходящий одиночный контейнер. Наборы, раскрытые в настоящем описании, как правило, также будут включать средства для содержания флакона(ов) в плотной защитной оболочке для коммерческой продажи, такие как, например, изготовленные методом литья под давлением или литья с раздувом пластиковые контейнеры, в которых содержатся нужные флаконы. Если в набор включена радиоактивная, хромогенная, флуорогенная или другая детектируемая метка или обнаруживающее средство, средство для мечения либо может быть предоставлено в том же контейнере, что и сама обнаруживающая или профилактическая/терапевтическая композиция, либо, альтернативно, может быть помещено во второй отдельный контейнер, в который эта вторая композиция может быть помещена и разделена на соответствующие аликвоты. Альтернативно, обнаруживающий реагент и метку можно готовить в одном контейнере, и в большинстве случаев набор, как правило, также будет включать средства для содержания флакона(ов) в плотной защитной оболочке для коммерческой продажи и/или удобную упаковку и средство доставки.

Также предложено устройство, или аппарат, для осуществления методов обнаружения или мониторинга, описанных в настоящем документе. Такой аппарат может включать камеру или пробирку, в которую может быть помещен образец, систему подачи жидкости, необязательно, включающую клапаны или насосы для направления потока образца через устройство, необязательно, фильтры для отделения плазмы или сыворотки от форменных элементов крови, смесительные камеры для добавления улавливающих реагентов или обнаруживающих реагентов и, необязательно, обнаруживающее устройство для определения количества детектируемой метки, связанной с иммунным комплексом улавливающего реагента. Поток образца может быть пассивным (например, под действием капиллярных, гидростатических или других сил, которые не требуют дальнейших манипуляций с устройством после нанесения образца) или активным (например, за счет применения силы, создаваемой механическими насосами, электроосмотическими насосами, центробежной силой или повышением давления воздуха) или может создаваться за счет сочетания активных и пассивных сил.

В следующих вариантах осуществления также предложен процессор, машиночитаемое устройство памяти и подпрограмма, хранящаяся на машиночитаемом устройстве памяти и адаптированная к выполнению на процессоре, для осуществления любых способов, описанных в настоящем документе. Примеры

подходящих компьютерных систем, оборудования и/или конфигураций включают персональные компьютеры, серверные компьютеры, портативные и переносные устройства, многопроцессорные системы, микропроцессорные системы, телевизионные приставки, программируемые бытовые электронные устройства, сетевые ПК, мини-компьютеры, универсальные вычислительные машины, распространяемое вычислительное оборудование, которое включает любые из вышеперечисленных систем или устройств, или любые другие системы, известные в данной области.

Общие методы

Стандартные методы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982, 1989, 2nd Ed., и 2001, 3rd Ed.) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993), *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные методы также описаны в сборнике Ausbel et al. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, в котором описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжей (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белка (том 3) и биоинформатика (том 4).

Методы очистки белков, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию, описаны (Coligan, et al. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York).

Методы химического анализа, химической модификации, посттрансляционной модификации, продуцирования слитых белков, гликозилирования белков описаны (см., например, Coligan, et al. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, p. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001), *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; p. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001), *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp 384-391).

Методы получения, очистки и фрагментации поликлональных и моноклональных антител описаны (Coligan, et al. (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999), *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, выше).

Стандартные методы характеристики взаимодействий лиганд/рецептор описаны (см., например, Coligan, et al. (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Одноцепочечные антитела и диатела описаны (см., например, Malecki et al., 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson and Kortt, 1999, *J. Immunol. Methods* 231:177-189; и патент США № 4946778).

Бифункциональные антитела описаны (см., например, Mack, et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7021-7025; Carter (2001), *J. Immunol. Methods*, 248:7-15; Volkel, et al. (2001), *Protein Engineering*, 14:815-823; Segal, et al. (2001), *J. Immunol. Methods*, 248:1-6; Brennan, et al. (1985), *Science*, 229:81-83; Raso, et al. (1997), *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985), *Science*, 229:202-2107; Traunecker, et al. (1991), *EMBO J.* 10:3655-3659; и патенты США № 5932448, 5532210 и 6129914).

Биспецифические антитела также описаны (см., например, Azzoni et al. (1998), *J. Immunol.* 161:3493; Kita et al. (1999), *J. Immunol.* 162:6901; Merchant et al. (2000), *J. Biol. Chem.* 275:9115; Pandey et al. (2000), *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng et al. (2001), *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst et al. (2000), *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999), *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Антитела могут быть конъюгированы, например, с низкомолекулярными лекарственными средствами, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитела полезны для терапии, диагностики, использования в наборе или других целей и включают антитела, связанные, например, с красителями, радиоизотопами, ферментами или металлами, например коллоидным золотом (см., например, Le Doussal et al. (1991), *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini et al. (1998), *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999), *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts et al. (2002), *J. Immunol.* 168:883-889).

Методы проточной цитометрии, включая активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS), описаны (см., например, Owens, et al. (1994), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001). *Flow Cytometry*, 2nd Ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003), *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая нуклеотидные праймеры и зонды, полипептидов и антител, для использования, например, в качестве диагностических реагентов, доступны (*Molecular Probes* (2003), каталог, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003), каталог, St. Louis, MO).

Стандартные методы гистологии иммунной системы описаны (см., например, Muller-Harmelink (ed.) (1986), *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, et al. (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, et al. (2002), *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Пакеты программ и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, сворачивания белка, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и вырав-

нивания последовательностей, доступны (см., например, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, et al. (2000), *Bioinformatics*, 16:741-742; Menne, et al. (2000), *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren, et al. (2002), *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986), *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Примеры

Пример 1. Идентификация полностью человеческого нейтрализующего РСВ антитела.

Для идентификации эффективных нейтрализующих чРСВ антител собирали сыворотку от доноров, давших информированное согласие, и анализировали на способность нейтрализовать вирус чРСВ *in vitro*. Для анализа нейтрализации образцы сыворотки сначала серийно разбавляли, а затем инкубировали с 600 БОЕ штамма чРСВ А, экспрессирующего усиленный зеленый флуоресцентный белок (PCB-GFP). PCB-GFP смешивали в соотношении 1:1 с разведенной сывороткой в общем объеме 200 мкл/лунку в 96-луночных круглодонных планшетах и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. По 100 мкл смеси на лунку затем переносили в планшеты, засеянные клетками HEp-2 (15000 клеток/лунку). Планшеты сканировали на приборе acumen® Cellista (TTP LabTech, Cambridge, MA) и данные экспортировали в виде количества событий GFP и общей интенсивности флуоресценции на лунку. Значения NT₅₀ рассчитывали с использованием GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) путем построения четырехпараметрической кривой. Определение титров в реакции связывания с формами "до слияния" и "после слияния" F-белка PCB методом ELISA выполняли следующим образом. На планшеты Nunc C96 Maxisorp® Nunc-Immuno™ (Thermo Scientific, Inc.) наносили по 50 мкл в лунку F-белок чРСВ в форме "до слияния" (см. McLellan et al., 2013, *Science*, 342:592) или "после слияния" (форма "после слияния" F-белка LZF21 состоит из эктодомена F дикого типа без пептида слияния (см. McLellan et al., 2011, *J. Virol.* 85:7788)) в концентрации 1 мкг/мл в PBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали буфером PBS/Tween 20, а затем блокировали 3% раствором нежирного молока в PBS. Затем 50 мкл серийно разведенных образцов сыворотки добавляли в лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение 90 мин. Планшеты промывали и добавляли HRP-конъюгированные антитела козы против IgG человека (SouthernBiotech, Birmingham, AL) в разведении 1:2000. Через 1 ч планшеты промывали и добавляли раствор SuperBlu Turbo TMB (ViroLabs, Inc., Sterling, VA) для развития окраски. Определяли поглощение (OD) при длине волны 450 нм на приборе Wallac 1420 VICTOR2™ Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA). Значения EC₅₀ рассчитывали с использованием GraphPad Prism 6 путем построения четырехпараметрической кривой. Группу доноров, у которых были обнаружены высокие титры антител при связывании и нейтрализации ЧРСВ, повторно приглашали для сдачи больших объемов крови для получения МКПК. Препараты МКПК получали в коммерческой организации-поставщике и приобретенные МКПК хранили в жидком азоте до дальнейшего использования.

МКПК от одного пациента демонстрировали хорошие титры при нейтрализации и отличались наивысшими титрами в анализе связывания методом ELISA с формой "после слияния" F-белка, при этом также демонстрировали одни из лучших характеристик связывания с формой "до слияния" F-белка (данные не представлены). Вследствие этого МКПК от этого донора были выбраны для выделения специфических для формы "после слияния" F-белка В-клеток памяти методом FACS.

Биотинилированный тримерный F-белок в форме "после слияния" (LZF21) получали путем биотинилирования LZF21 (McLellan et al., 2011, *J. Virol.* 85:7788) с использованием набора для биотинилирования E-Z Link™ Sulfo-NHS-LC (Life Technologies, Grand Island, NY) в соответствии с инструкциями производителя. Белок LZF21 состоит из эктодомена F-белка дикого типа без пептида слияния (McLellan et al., 2011, *J. Virol.* 85:7788). Специфическая для F-белка "после слияния" мышинная гибридома 4D7 представляет собой мышиную гибридому, полученную путем иммунизации мышей Balb/c вирусом PCB A2. Мышей Balb/c иммунизировали дважды внутрибрюшинно вирусом PCB A2 и выполняли бустерную внутривенную инъекцию 20 мкг очищенного PCB A2 (Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD) за три дня до проведения слияния клеток. Селзенки мышей собирали и проводили слияние спленоцитов с клетками миеломы SP2/0 при помощи полиэтиленгликоля. Клетки вносили в среду D (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC), высевали в квадратные чашки Петри размером 245×245 мм и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 2 недель. Отдельные колонии отбирали с использованием ClonePix (Genetix), переносили в 96-луночные планшеты и инкубировали, как указано выше, в течение 1 недели. Проводили скрининг супернатантов на анти-PCB активность методом ELISA, используя очищенный PCB A2. Положительные клоны, включая 4D7, наращивали и затем субклонировали методом серийных разведений. Проводили скрининг субклонов, как описано выше, клон 4D7-8 был идентифицирован и использован для оптимизации окрашивания конъюгатом LZF21-биотин В-клеток памяти с использованием FACS (данные не представлены). В процессе данных экспериментов по оптимизации было установлено, что концентрация 1,5 мкг/мл конъюгата LZF21-биотин представляла собой наилучшую концентрацию для окрашивания специфических для формы "после слияния" F-белка В-клеток памяти. Специфичность реакции окрашивания была продемонстрирована с использованием посторонней мышинной гибридомы в качестве отрицательного контроля и конкуренции за связывание с 100-1000X избытком немеченного

LZF21.

Антигенспецифичные В-клетки памяти были обозначены CD3⁺CD19⁺IgG⁺LZF21⁺. Эти клетки вносили в 96-луночные планшеты (одна клетка/луночку), содержащие экспрессирующие лиганд CD40 клетки линии HEK293 (полученные стандартными молекулярно-биологическими методами) и IL-21 (Sino Biological Inc., North Wales, PA). После тестирования 30 образцов было показано связывание супернатанта из 6 лунок с формой "после слияния" F-белка в анализе ELISA (проведенном, как описано выше). Эти образцы также отличались связыванием с формой "до слияния" F-белка (данные не представлены). Данные шесть образцов затем тестировали в анализе нейтрализации, как описано выше, без разбавления. Наличие нейтрализующей активности было продемонстрировано на основании сокращения количества GFP-событий. Из шести образцов два образца (обозначенные RB1 и RB11) продемонстрировали полную нейтрализацию штамма чРСВ А (см. табл. 3).

Таблица 3

Лунка	ELISA, 450 нм			Нейтрализация	
	IgG	F-белок «после слияния»	F-белок «до слияния»	GFP-события	% нейтрализации
A8	0,641	1,743	1,222	783	
A9	1,743	1,915	1,754	689	
A11	1,81	1,905	1,555	500	
B1	1,82	1,925	1,910	0	100%
B11	1,851	1,748	1,900	1	100%
B12	1,801	1,838	1,679	548	
Контроль	0,037	0,038	0,044	596	

Экстрагирование РНК и ОТ-ПЦР для культуры отсортированных единичных В-клеток памяти.

Часть 1.

РНК из лизата наилучшего клона RB1 в 96-луночной планшете экстрагировали с использованием набора RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) в соответствии с руководством производителя. Концентрацию РНК определяли с использованием NanoDrop™ 200°C (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE) при длине волны УФ-излучения 260 нм. РНК, экстрагированную из лунки с RB1, использовали в качестве матрицы при амплификации методом ОТ-ПЦР генов тяжелой и легкой цепей антитела, используя последовательности праймеров, созданных на основании лидерной последовательности (прямой) и 3'-конца IgG JH, константной области каппа или константной области лямбда (обратный).

Набор OneStep для ОТ-ПЦР (Qiagen Inc, Valencia, CA) использовали в соответствии с инструкциями производителя для амплификации последовательностей антитела. Условия ПЦР были следующими: 50°C в течение 30 мин, 95°C в течение 15 мин, [94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с, 72°C в течение 1 мин] × 40, 72°C в течение 10 мин и хранение при 4°C.

Продукт ОТ-ПЦР непосредственно использовали в качестве матрицы для вложенной ПЦР.

Часть 2. Вложенная ПЦР.

Продукты ОТ-ПЦР использовали в качестве матриц во вложенной ПЦР для амплификации вариабельных областей антитела с ДНК-полимеразой rfx50 (Invitrogen, Cat. No. 12355-012).

Праймеры для вложенной ПЦР были разработаны на основе последовательностей зародышевой линии каркасной области 1 вариабельных областей тяжелой и легкой цепей IgG человека.

1 мкл продукта ОТ-ПЦР смешивали с 2,5 мкл 10X ПЦР-буфера, 2,5 мкл 10X раствора PCRX Enhancer (Invitrogen), 0,5 мкл смеси дНТФ, 0,5 мкл объединенных прямых праймеров (10 мкМ каждый), 0,5 мкл обратного праймера (10 мкМ), 0,5 мкл ДНК-полимеразы rfx50 и 17 мкл воды. Условия вложенной ПЦР были следующими: 2 мин при 94°C, 10 циклов при 94°C в течение 30 с, 50°C в течение 30 с, 68°C в течение 1 мин, с последующими 30 циклами при 94°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с, 68°C в течение 1 мин, затем 7 мин элонгации при 68°C, с последующим кратковременным хранением при 4°C.

Полученные для RB1 продукты вложенной ПЦР при ПЦР-амплификации VH и VK или VH и VL использовали в качестве матриц для ПЦР с перекрывающимися праймерами со специфическими линкерами для совместного отжига генов легкой и тяжелой цепей антитела для облегчения следующего этапа клонирования методом in-fusion.

Часть 3. ПЦР с перекрывающимися праймерами и in-fusion клонирование.

В данной реакции использовали ДНК-полимеразу rfx50 (Invitrogen). Были разработаны прямой и обратный праймеры для облегчения in-fusion клонирования продуктов ПЦР с перекрывающимися праймерами в клонирующий вектор. 1 мкл продукта вложенной ПЦР тяжелой цепи, 1 мкл продукта вложенной ПЦР легкой цепи и 1 мкл линкера смешивали с 5 мкл 10X ПЦР-буфера, 5 мкл 10X PCRX enhancer, 1 мкл смеси дНТФ, 1 мкл прямого праймера (10 мкМ), 1 мкл обратного праймера (10 мкМ), 1 мкл ДНК-полимеразы rfx50 и 33 мкл воды.

Условия ПЦР были следующими: 94°C в течение 2 мин, [94°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с, 68°C в течение 2 мин] × 10, [94°C в течение 30 с, 65°C в течение 30 с, 68°C в течение 2 мин] × 30, 68°C в

течение 7 мин, хранение при 4°C.

Продукты ПЦР с перекрывающимися праймерами очищали в агарозном геле для in-fusion клонирования (был получен продукт ПЦР с перекрывающимися праймерами VH+VK RB1 размером примерно 1,2 т.п.н.). Продукты ПЦР с перекрывающимися праймерами VH+VK RB1 клонировали в вектор pMab11Exp2 (с лидерной последовательностью OmpA для экспрессии легкой цепи, с лидерной последовательностью PelB для экспрессии тяжелой цепи) методом in-fusion клонирования. Использовали набор для клонирования In-Fusion HD® (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Трансформанты отбирали и отправляли в компанию GeneWiz, Inc. (South Plainfield, NJ) для секвенирования.

Результаты секвенирования анализировали с использованием Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности RB1 представлены в табл. 7 (аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи RB1, выделенного из образца пациента, приведены в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 8 соответственно). Из-за дизайна обратных праймеров Jh, имеющих нуклеотидное изменение, остаток изолейцина, присутствующий в природной последовательности в положении 125, был заменен на остаток треонина в экспрессированном белке (полученная варибельная область тяжелой цепи RB1 представлена SEQ ID NO: 7). Аминокислотные последовательности для генов варибельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела RB1 были посланы в компанию GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) для кодон-оптимизации и преобразования IgG1 человека, а также для временной экспрессии и продуцирования в клетках CHO. Синтезированные молекулы ДНК субклонировали в вектор pTT5 для экспрессии в клетках CHO-3E7. Реконбиантные плазмиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи каждого антитела, были временно совместно трансфицированы в культуры клеток CHO-3E7. Супернатанты клеточных культур, собранные в день 6, использовали для очистки на колонке с белком А. Очищенное IgG1 RB1 человека использовали в анализе нейтрализации и других характеризующих экспериментах, как описано в примере 2.

Пример 2. Характеризация анти-чРСВ антител.

Антитело RB1 связывалось как с формой "до слияния" F-белка, так и с формой "после слияния" F-белка, в анализе ELISA, как описано в примере 1, с величиной EC₅₀ в диапазоне 1-10 нг/мл, в то время как антитело D25 (см. Kwakkenbos et al., 2010, Nature Medicine, 16:123-128) связывалось предпочтительно с формой "до слияния" F-белка, см. фиг. 1A, 1B.

мАт	F-белок «до слияния» (EC ₅₀ нг/мл)	F-белок «после слияния» (EC ₅₀ нг/мл)
D25	8,939	>10000
паливизумаб	17,37	10,5
RB1	7,053	14,08

Нейтрализующую активность RB1, RB11 и некоторых контрольных антител, описанных в литературе (D25, паливизумаб, полноразмерное [антитело D25 было получено в собственной организации на основании опубликованной последовательности и синагис® (паливизумаб) приобретали у компании Myoderm, Norristown, PA]), сравнивали в отношении штамма РСВ А Long (ATCC номер VR-26™) и штамма РСВ В Washington 18537 (ATCC номер VR-1580™). Тестируемые образцы серийно разводили в три раза в ЕМЕМ с добавлением 2% инактивированной нагреванием ЭБС для получения 11 концентрационных точек. Затем серийно разведенные образцы смешивали с равными объемами среды ЕМЕМ с добавлением 2% инактивированной нагреванием ЭБС, содержащей 100 БОЕ/лунку штаммов РСВ А или В. После инкубации при 37°C в течение 1 ч 100 мкл клеток Нер-2 в концентрации 1,5×10⁵ клеток/мл переносили в 96-луночные планшеты, содержащие смесь вирус/антитело. Через 3 дня после инфицирования клетки промывали один раз PBS, а затем фиксировали в 80% ацетоне в течение 10 мин при комнатной температуре. Смесь специфичных в отношении F-белка РСВ (mAb143-F3-B138) и N-белка РСВ (34C9) мышиных мАт (полученных в собственной организации) добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали буфером PBS/0,05% Tween 20, в планшеты добавляли биотинилированное антитело лошади против IgG мыши и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали буфером PBS/0,05% Tween. Конъюгат поглощающего в ИК-области красителя со стрептавидином использовали для обнаружения специфичного для РСВ сигнала и два клеточных красителя для нормирования анализа добавляли в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 1 ч в темноте. После 1-часовой инкубации планшеты промывали, сушили на воздухе в течение 20 мин в темноте и просчитывали в автоматизированной системе обработки изображений Licor Aegius® с использованием 700-канального лазера для нормирования клеток и 800-канального лазера для обнаружения специфичного для РСВ сигнала. Рассчитывали коэффициенты 800/700 и процент нейтрализации и значения IC₅₀ определяли путем построения четырехпараметрической кривой в GraphPad.

Антитело RB1 было способно нейтрализовать штаммы РСВ А и РСВ В с равной эффективностью (IC_{50} 1-5 нг/мл). RB1 также продемонстрировало более эффективную нейтрализацию РСВ в сравнении с контрольными антителами, см. фиг. 2А, 2В и табл. 4.

Таблица 4

Способность RB1 к связыванию и нейтрализации
в сравнении с контрольными антителами

	Связывание F-белка «до слияния»	Связывание F-белка «после слияния»	Нейтрализующая активность, IC_{50} (нг/мл)	
			PCV A/Long	PCV B/washington
RB1	+	+	3	1,7
D25	+	-	3,6	25,9
AM22	+	-	50	172,8
131-2A, мышинное (Millipore)	+/-	+	1046	>10000
4D7 (Merck), мышинное	+/-	+	2408	>10000
пализумаб	+	+	211,5	166
МРЕ8	+	-	106,6	46
101F, мышинное	+	+	67	43,6
AM14	+	-	3,2	1,9

Определение аффинности связывания RB1 для формы "до слияния" и формы "после слияния" F-белка: кинетическую активность связывания антитела RB1 к F-белку РСВ человека (полученного, как описано в примере 1) измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Примерно 5000 ЕО антител против IgG мыши, GE Healthcare, каталожный номер BR-1008-38, или примерно 13000 ЕО антител козы против IgG крысы, специфичных для фрагмента Fc γ , Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 112-006-071, иммобилизовали связыванием через аминокислотные группы на сенсорном чипе CM5 серии S, Cat. No. BR-1005-30.

Сенсограммы связывания за вычетом фона использовали для анализа констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также равновесной константы диссоциации K_D . Полученные наборы данных подгоняли к модели Ленгмюра для связывания 1:1 с использованием оценочной программы Biacore T200 (версия 2.0). В табл. 5 приведены значения аффинности антитела к F-белку РСВ человека при связывании с формой "до слияния" и формой "после слияния" F-белка РСВ.

Таблица 5

Измерение аффинности RB1 в отношении формы "до слияния" F-белка и
формы "после слияния" F-белка РСВ с использованием Biacore

Белок	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
Форма «до слияния» F	$4,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,031
Форма «после слияния» F	$2,2 \times 10^6$	9×10^{-4}	0,41

RB1 очень сильно связывает форму "до слияния" F-белка с $K_D \sim 31$ пМ. Величина K_D для связывания формы "после слияния" была на порядок ниже, 0,41 нМ. Величина K_D для D25, приведенная в публикации международной патентной заявки № WO 2014/121021 A1, составляла 57 пМ. Кроме того, антитело RB1 остается дольше связанным с формой "до слияния", чем с формой "после слияния", F-белка, о чем свидетельствуют более низкие скорости диссоциации $1,4 \times 10^{-4}$ по сравнению со скоростью в случае формы "после слияния" F-белка.

Пример 3. Картирование эпитопов антитела RB1.

Эпитоп связывания RB1 на F-белке "после слияния" картировали методом аланин-сканирующего мутагенеза. Картирование эпитопа было проведено с использованием мутагенеза методом дробовика в компании Integral Molecular, как описано. (Davidson and Doranz, 2014, Immunology, 143(1):13-20). Для конструирования библиотеки с помощью мутагенеза методом дробовика экспрессионный вектор F-белка РСВ подвергали мутагенезу для создания библиотеки клонов, каждый из которых представлял отдельный точечный мутант, при этом были кумулятивно охвачены все остатки в белке. Были сконструированы библиотеки с использованием аланин-сканирующего мутагенеза, который представляет собой более кон-

тролируемый метод определения вклада боковых цепей каждого остатка. С использованием полуавтоматических роботизированных операций каждую мутантную плазмиду индивидуально клонировали, секвенировали, получали мини-препараты и размещали в формате 384-луночного микропланшета для многократной трансфекции, экспрессии и анализов связывания антигена в клетках человека. Выполняли скрининг библиотеки, полученной методом аланин-сканирующего мутагенеза, против RB1 на утрату связывания антитела. Два остатка, аргинин-429 и изолейцин-432, были идентифицированы как критичные для связывания RB1. См. ниже и фиг. 3А. RB1, судя по всему, представляет собой МАТ к сайту IV (101F-подобное), а антитела, связывающие сайт IV, как сообщается в литературе, связывают как форму "до слияния", так и форму "после слияния" F-белка.

Способность к связыванию (% ДТ)			
Мутация	МАТ RB1	Fab RB1	МАТ D25
R429A	33,1 (27)	5,1 (4)	385,0 (13)
I432A	36,7 (39)	3,6 (7)	327,8 (161)

Авторы изобретения также провели совместную кристаллизацию Fab RB1 с формой "до слияния" F-белка для лучшего понимания связывания эпитопа. Данные дифракции получали от кристаллов с разрешением 3,4-3,5 Å. Антитело RB1 связывается с формой "до слияния" F-белка посредством взаимодействий с петлями CDR как тяжелой, так и легкой цепей. Петля CDR3 легкой цепи взаимодействует с боковой цепью Arg 429 за счет образования двух водородных связей между атомами кислорода карбонильных групп Phe 91 и Leu 92 и атомами азота гуанидиновых групп Arg 429. Также на легкой цепи Asp 50 и Glu 55 в петле CDR2 расположены так, что образуют водородные связи с Asn 426 и Lys 445 в РСВ. Экстенсивные взаимодействия осуществляются через петлю CDR3 тяжелой цепи RB1, которая за счет Tyr 104 и Tyr 110 образует поверхность для ван-дер-ваальсовых взаимодействий с Ile 432 в РСВ. Lys 433 в РСВ образует водородную связь с Asn 107 в петле CDR3. Судя по кристаллической структуре, легкая цепь RB1 также укладывается напротив Glu 161 и Ser 182 или соседнего мономера тримера "до слияния" РСВ.

Связывающий эпитоп, идентифицированный для RB1, является высококонсервативным среди 944 из 946 последовательностей F-белка, описанных в литературе. Это свидетельствует о том, что ожидается очень низкая устойчивость к антителам, направленным на данную область.

Пример 4. Анти-PCV активность антител против РСВ в животной модели.

Антитело RB1 сравнивали с D25 и паливизумабом с точки зрения возможной защиты в модели заражения хлопкового хомяка. В исследовании использовали антитела паливизумаб, D25 и RB1, введенные в дозе 2,5 мг/кг и серийно разведенные 10-кратно до 0,25 мг/кг. В данной модели пассивной иммунотерапии хлопковым хомякам вводили RB1, D25 или паливизумаб в разных концентрациях в день d0 и через один день заражали 10^5 БОЕ РСВ. Титры заражающего вируса РСВ в носу и легких определяли через четыре дня после заражения и использовали для определения распространения вируса в анализе бляшкообразования.

Хлопковые хомяки: По меньшей мере пять хлопковых хомяков (*Sigmodon hispidus*) в возрасте 3-7 недель со средней массой тела примерно 100 г получали из SAGE Labs (Boyertown, PA). Обычный корм для грызунов и воду предоставляли животным *ad libitum*.

Антитела: 100 мг лиофилизированного паливизумаба (Myoderm, Norristown, PA) растворяли в воде до концентрации 100 мг/мл. Другие антитела были экспрессированы и очищены в собственной организации.

Препараты антител: Буферы формулирования были подобраны для каждого антитела с целью стабилизации белков и предотвращения осаждения. Препараты были следующими: RB1 и D25 разводили в 1× фосфатно-солевом буфере, pH 7,2. Паливизумаб формулировали в соответствии с рекомендациями производителя, растворяя в дистиллированной H₂O, в результате чего белок находился в буфере, содержащем 25 мМ гистидина и 1,3 мМ глицина, при pH 6,0.

Приготовление растворов для дозирования, введение и анализы.

Пять животных в случайном порядке взвешивали для определения средней массы тела в экспериментальных группах. Препараты готовили примерно за 1 ч до введения животным. Замороженные маточные растворы антител размораживали в ледяной бане только один раз. Каждое антитело разбавляли до соответствующей концентрации дозы, которую предстояло вводить животным в каждой группе. В день 0 (начало исследования) животных, распределенных в каждую группу случайным образом, слегка анестезировали с использованием 1-4% изофлурана и вводили 0,1 мл внутримышечно в правую четырехглавую мышцу шприцем 26G с иглой. Животные восстанавливались после седации в течение 2 мин. Через 24 ч (\pm 2 ч) хлопковых хомяков анестезировали с использованием 1-4% изофлурана, собирали кровь через ретроорбитальный синус, а затем немедленно вводили через ноздри 0,1 мл $1 \times 10^{5.5}$ БОЕ вируса дикого типа РСВ A2 или РСВ В Washington в среде Е Уильямса. Через четыре дня после инокуляции животных умерщвляли ингаляцией CO₂, легкие (левые доли) и носовые раковины извлекали и гомогенизировали в 10 объемах содержащего сбалансированный солевой раствор Хэнка (Lonza) буфера SPG (глута-

мат-фосфат сахарозы) на ледяной бане. Образцы осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин, разделяли на аликвоты, быстро замораживали и немедленно помещали на хранение при -70°C до тестирования в анализе бляшкообразования.

Как показано на фиг. 4А-4Д и 5А-5Д, антитело RB1 было способно вызывать 2-3 log уменьшение титров вируса как РСВ А, так и РСВ В в легких и носу животных в дозе 2,5 мг/кг, что было аналогично показателям D25, но лучше, чем показатели паливизумаба, который был не способен влиять на титры вируса в носу.

Пример 5. Конструирование Fc RB1.

Действие неонатального Fc-рецептора для IgG (FcRn) в процессе переноса гуморального иммунитета от матери к плоду хорошо изучено. Кроме того, на протяжении жизни FcRn защищает IgG от распада, что объясняет продолжительное время полужизни антител этого класса в сыворотке. См., например, Israel et al., 1996, *Immunology*, 89:573-8. FcRn связывается с Fc-фрагментом IgG в сайте, отличающемся от сайтов связывания классических Fc γ R или компонента C1q комплемента. Кристаллическая структура комплекса FcRn-Fc показала, что FcRn связывается с шарнирной областью CH2-CH3 IgG антитела. Отличительной характеристикой взаимодействия IgG-FcRn является строгая зависимость от pH. Связывание IgG-FcRn происходит при нейтральном значении pH (6,0) в лизосоме, в то время как диссоциация происходит при нейтральном значении pH (7,4) внеклеточной среды. Кислая среда (pH 6,0-6,5) в лизосомах позволяет FcRn связываться с Fc-областью IgG со значениями аффинности в нижнем микромолярном диапазоне и защищать его от катаболизма. Защищенный FcRn-связанный IgG впоследствии переносится на клеточную поверхность и высвобождается во внеклеточную среду. Этот процесс защищает антитела, уменьшая их подверженность внеклеточному распаду.

Была проведена генная модификация Fc антитела RB1 в попытке увеличить продолжительность времени полужизни. RB1+YTE представляет собой производное RB1 с тройной мутацией (M252Y/S254T/T256E (YTE)), введенной в Fc-фрагмент RB1. Этот набор мутаций YTE приводит к усилению связывания антитела с неонатальными Fc-рецепторами, приводя к увеличению времени полужизни в организме человека. См., например, Dall'Acqua et al., 2006, *J. Biol. Chem.* 281:23514-24. Мутации в трех аминокислотах (YTE: M252Y/S254T/T256E) в Fc-области мотавизумаба привели к 10-кратному увеличению связывания FcRn *in vitro* при pH 6,0 как в образцах от человека, так и от обезьян и, как показано впоследствии, 4-кратному увеличению времени полужизни в сыворотке обезьян *in vivo*. См. Robbie et al., 2013, *Antimicrob Agents Chemother.* 57:6147-53.

Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей антитела RB1+YTE были посланы в компанию GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) для кодон-оптимизации и преобразования IgG1 человека, а также для временной экспрессии и продуцирования в клетках CHO. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности RB1+YTE приведены в табл. 7.

Синтезированные молекулы ДНК субклонировали в вектор pTT5 для экспрессии в клетках CHO-3E7. Рекombинантные плазмиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи каждого антитела, были временно совместно трансфицированы в культуры клеток CHO-3E7. Супернатанты клеточных культур, собранные в день 6, использовали для очистки на колонке с белком А. Очищенное IgG1 человека RB1+YTE использовали в анализе нейтрализации и других характеризующих экспериментах.

Пример 6. Характеризация RB1+YTE.

Антитело RB1+YTE связывалось с F-белком в анализе ELISA, проведенном, как описано в примере 1, с величиной EC_{50} в диапазоне от 1,97 до 2,457 нг/мл, см. фиг. 6. Нейтрализующую активность RB1+YTE и контрольного антитела, описанного в литературе (мотавизумаб, MedImmune, Gaithersburg, MD; см. публикацию патентной заявки США № US 20110158985), полученного в собственной организации на основании опубликованной последовательности, сравнивали в отношении штамма РСВ А Long (ATCC номер VR-26TM) и штамма РСВ В Washington 18537 (ATCC номер VR-1580TM). Тестируемые образцы серийно разводили в три раза в ЕМЕМ с добавлением 2% инактивированной нагреванием ЭБС для получения 11 концентрационных точек. Затем серийно разведенные образцы смешивали с равными объемами среды ЕМЕМ с добавлением 2% инактивированной нагреванием ЭБС, содержащей 100 БОЕ/лунку штаммов РСВ А или В. После инкубации при 37°C в течение 1 ч 100 мкл клеток HEp-2 в концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/мл переносили в 96-луночные планшеты, содержащие смесь вирус/антитело. Через 3 дня после инфекции клетки промывали один раз PBS, а затем фиксировали в 80% ацетоне в течение 10 мин при комнатной температуре. Смесь специфичных в отношении F-белка РСВ (mAb143-F3-B138) и N-белка РСВ (34C9) мышиных mAb (антитела mAb143-F3-B138 и 34C9 получали в собственной организации путем иммунизации мышей соответствующими антигенами и иммортализации В-клеток с использованием технологии гибридом) добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали буфером PBS/0,05% Tween 20, в планшеты добавляли биотинилированное антитело лошади против IgG мыши и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали буфером PBS/0,05% Tween. Конъюгат поглощающего в ИК-области красителя со стрептавидином использовали для обнаружения специфичного для РСВ сигнала и два клеточных красителя для нормирования анализа добавляли в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 1 ч в тем-

ноте. После 1-часовой инкубации планшеты промывали, сушили на воздухе в течение 20 мин в темноте и просчитывали в автоматизированной системе обработки изображений Licor Aegius® с использованием 700-канального лазера для нормирования клеток и 800-канального лазера для обнаружения специфичного для РСВ сигнала. Рассчитывали коэффициенты 800/700 и процент нейтрализации и значения IC_{50} определяли путем построения четырехпараметрической кривой в GraphPad.

Антитело RB1+YTE было способно нейтрализовать штаммы РСВ А и РСВ В с равной эффективностью (IC_{50} 5-10 нг/мл), см. табл. 6.

Таблица 6

Измерение нейтрализации и аффинности RB1+YTE для формы "до слияния" F-белка и формы "после слияния" F-белка РСВ

мАт	IC_{50}		Кинетические константы			Кинетические константы		
	нейтрализации <i>in vitro</i> (нг/мл)		(форма «до слияния» F)			(форма «после слияния» F)		
	РСВ А	РСВ В	K_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)	K_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
RB1	3	1,7	$4,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,031	$2,2 \times 10^6$	9×10^{-4}	0,41
RB1+YTE	3,6	3,49	$3,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-4}$	0,071	$1,4 \times 10^6$	7×10^{-4}	0,48

Введение мутации YTE в Fc-фрагмент RB1 не привело к изменению способности антитела нейтрализовать штаммы РСВ А и В *in vitro*. Показатели *in vitro* эффективности нейтрализации РСВ А составляли 3 и 3,6 нг/мл в случае RB1 и RB1+YTE соответственно. Показатели *in vitro* эффективности нейтрализации РСВ В составляли 1,7 и 3,49 нг/мл в случае RB1 и RB1+YTE соответственно. Кинетические константы, измеренные с использованием Biacore, были аналогичными для RB1 и RB1+YTE, свидетельствуя о том, что введение мутаций YTE в Fc-область антитела не привело к изменению его антигенсвязывающей способности.

Не соответствующее требованиям GLP (надлежащей лабораторной практики) фармакокинетическое исследование было проведено в Исследовательском центре Новой Иберии (UL Lafayette, LA). Восемь ранее не получавших биологические препараты самцов макак-резусов случайным образом распределяли в одну из двух групп исследования (n=4 в группе). Каждое животное получало внутривенно (в/в) одну дозу 10 мг/кг RB1+YTE или мотавизумаба-YTE. Образцы крови собирали до введения доз в день 0, через 0,5, 1, 3, 8 и 24 ч после дозирования и через 1, 2, 3, 5, 7 и 10 дней после дозирования. ЭХЛ иммуноанализы использовали для количественного определения RB1+YTE (человеческое \times [PCB] мАт (RB1-YTE) IgG1/каппа (CE)) и мотавизумаба-YTE (гуманизированное \times [PCB] мАт IgG1/каппа) в сыворотке макак-резусов.

В анализе использовали биотинилированное антитело мыши против каппа-цепи IgG человека (BD Biosciences, San Jose, CA) в качестве улавливающего реагента и антитело sulfoTAG мыши против Fc-области IgG человека в качестве обнаруживающего реагента (SouthernBiotech Birmingham, AL). Установленный нижний предел количественного определения (НПКО) анализа составлял 1,37 нг/мл с минимальным необходимым разведением (МНР) 20.

Фармакокинетику RB1+YTE и мотавизумаба-YTE оценивали в течение вплоть до 10 дней у макак-резусов после внутривенного введения дозы 10 мг/кг с использованием одного и того же анализа для количественного определения RB1+YTE и мотавизумаба-YTE. Для каждого животного использовали некомпартментную модель при построении кривых зависимости сывороточных концентраций от времени с использованием Phoenix Winnonlin 6.3 (Certara, NJ) для оценки площади под кривой ($AUC_{0-10\text{дней}}$). Значения $AUC_{0-10\text{дней}}$ усредняли для 4 животных в каждой группе приема препарата и представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Для RB1+YTE $AUC_{0-10\text{дней}} = 1159 \pm 116$ мкг/мл \times день и для мотавизумаба-YTE $AUC_{0-10\text{дней}} = 1381 \pm 63,0$ мкг/мл \times день.

RB1+YTE (обозначенное RB1-YTE на подписи к фигуре) и мотавизумаба-YTE демонстрировали сходные профили сывороточных концентраций и фармакокинетики у макак-резусов, см. фиг. 7. Кроме того, было установлено, что ФК RB1+YTE у низших приматов была сопоставима с ФК мотавизумаба-YTE у яванских макак, описанной в литературе. См. Dall'Acqua et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24.

Все литературные источники, цитированные в настоящем описании, включены посредством ссылки в такой же степени, как если было бы специально и индивидуально указано, что каждая отдельная публикация, информация в базе данных (например, последовательности в Genbank или информация в GeneID), патентная заявка или патент включены посредством ссылки. Данное заявление о включении посредством ссылки, согласно намерениям авторов изобретения и в соответствии с 37 C.F.R. 1.57(b) (1), должно относиться к любой и каждой отдельной публикации, информации в базе данных (например, последовательностям в Genbank или информации в GeneID), патентной заявке или патенту, все из которых четко идентифицированы в соответствии с требованиями 37 C.F.R. 1.57 (b) (2), даже если при цитировании литературного источника сразу же не следует заявление о включении его посредством ссылки. Наличие специальных заявлений о включении посредством ссылки, если таковые имеются, в тексте специ-

фикации никоим образом не умаляет данное общее заявление о включении посредством ссылки. Цитирование литературных источников в настоящем описании не является признанием того, что литературный источник является соответствующим предшествующим уровнем техники, равно как и не является признанием содержания или даты этих публикаций или документов.

Настоящее изобретение не ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области из приведенного выше описания и сопроводительных фигур. Такие модификации должны входить в объем прилагаемой формулы изобретения.

Таблица 7

Информация о последовательностях

SEQ ID NO:	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	RB1 H - CDR1	DSAMS
2	RB1 H - CDR2	FIKSKTYGGTKEYAASVKG
3	RB1 H - CDR3	GAPYGGNSDYYYGLDV
4	RB1 L - CDR1	RTSQDVRGALA
5	RB1 L - CDR2	DASSLET
6	RB1 L - CDR3	QQFLDFPFT
7	RB1 VH	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSAMSWVRQAPG KGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQ MNSLKTЭДТАVYYCTRGAPYGGNSDYYYGLDVWGQGTTVIVS S
8	RB1 VL (выделенная из образца пациента)	DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITCRTSQDVRGALAWYQQKPGK APKLLIFDASSLETGVPSRFSGSGSGTVFTLTISLQPEDFA AYYCQQFLDFPFTFGQGTTRLEIKRT
9	RB1 VH (выделенная из образца пациента)	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSAMSWVRQAPG KGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQ MNSLKTЭДТАVYYCTRGAPYGGNSDYYYGLDVWGQGTTVIVS S
10	Лидерная последовательность	MGWSCIIILFLVATATGVHS

11	RB1 VH+лидерная	MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCT VSGFSDDSAMSWVRQAPGKGLEWISFIKSKTYGGTKKEYAAS VKGRFTISRDDSKNIAYLQMNLSLKTЭДТАVYYCTRGAPYGGN SDYYYGLDVWGQGTTVTVSS
12	RB1 VL+лидерная	MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSQDVRGALAWYQQKPGKAPKLLIFDASSLETGVPSRFSGS GSGTVFTLTISLQPEDFAAYCQQLDFPFTFGQGTREIK RT
13	Константный домен тяжелой цепи - IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVKDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PEPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Константный домен легкой цепи каппа	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD HKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
15	Нуклеиновая кислота, кодирующая RB1 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACGGCCA GGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGCACAGTTTCTGGATTACAGC TTTGACGACTCTGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAATGGATAAGTTTCATTAAGTAAACTTAT GGTGGGACAAAAGAATACGCCCGCTCTGTGAAAGGCAGGTTC ACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAACATCGCCTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGATATTATGT ACTAGAGGGGGCCCTTACGGCGGTAACCTCCGATTACTACTAC GGTTTGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCC TCA
16	Нуклеиновая кислота, кодирующая RB1 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCGGACAAGTCAGGAC GTTAGAGGTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACAGGGAAA GCTCCTAAACTCCTGATCTTTGATGCCTCCAGTTTGGAGACT GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGTT TTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA GCTTATTACTGTCAGCAGTTTCTTGATTTCCCTTTCACCTTC GGCCAGGGGACAGACTGGAATCAACGTACG

17	Нуклеиновая кислота, кодирующая RB1 VH (кодон-оптимизированная)	GAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGGGGGGGGCTGGTGCGGCCT GGCAGGTCTCTGAGACTGAGCTGCACCGTGAGCGGCTTCTCC TTTGACGATTTGCCATGAGCTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGC AAGGGACTGGAGTGGATCTCCTTCATCAAGTCTAAGACCTAC GGCGGCACAAAGGAGTACGCCGCTTCCGTGAAGGGCCGGTTT ACCATCAGCAGGGACGATTCCAAGAACATCGCCTATCTGCAG ATGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGC ACAAGAGGAGCTCCTTACGGAGGCAACAGCGACTACTATTAC GGACTGGACGTGTGGGGACAGGGAACCACAGTGACCGTGAGC TCC
18	Нуклеиновая кислота, кодирующая RB1 VL (кодон-оптимизированная)	GACATTCAGATGACTCAGTCCCCTTCAAGTCTGAGCGCCTCC GTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCCGGACCAGCCAGGAT GTGCGGGGCGCCCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAG GCCCCAAGCTGTGTATCTTTGACGCTAGCTCCCTGGAGACC GGCGTGCCCTCCAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGTG TTCACCCTGACAATCTCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCC GCTTACTATTGCCAGAGTTCTTGGATTTCCTTCCCTTCACCTTC GGCCAAGGCACACGGCTGGAGATCAAGAGGACC
19	Нуклеиновая кислота, кодирующая лидерную последовательность тяжелой цепи	ATGGGTGGTCTGTATTATCCTGTTCTCGGTCGCCACTGT ACTGGGGTCCACTCA
20	Нуклеиновая кислота, кодирующая лидерную последовательность легкой цепи	ATGGGCTGGTCTGTATTATCCTGTTCTCGGTCGCCAACC ACTGGTGTGCATAGC

21	Нуклеиновая кислота, кодирующая константный домен тяжелой цепи - IgG1	<p>GCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGTGTCCCACTGGCTCCCTCT TCCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTG GTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAC TCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACATTTCCAGCTGTG CTGCAGTCTCTGGCCTGTATTCCTGAGCTCCGTGGTGACC GTGCCCTCTAGCTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGTAAC GTGAATCACAAGCCAAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTC GAGCCCAAGTCTGTGATAAGACCCACACATGCCCCCTTGT CCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTT CCACCCAAGCCTAAGGCACCCCTGATGATCTCTAGGACCCCC GAGGTGACATCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCT GAGGTGAAGTTTAACTGGTACGTCGATGGCGTGGAGGTGCAC AATGCCAAGACAAAGCCAGAGAGGAGCAGTATAACTCCACC TACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAATAAGGCC CTGCCCGCTCCTATCGAGAAGCATTCTTAAGCCAAGGGC CAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTATACACTGCCTCCATCCAGA GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCTGTGACATGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCTTCTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGCCAGCCAGAGAACAATTATAAGACCACACCCCTGTG CTGGACAGCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAAGTGT TCTGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCACTGGTAAA</p>
22	Нуклеиновая кислота, кодирующая константный домен легкой цепи каппа	<p>CTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCCCTTCTGACGAG CAGCTGAAGTCTGGCACAGCTAGCGTGGTGTCCCTGTGAAC AATTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGAT AACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACCCGAG CAGGACTCTAAGGATAGCACATATTCCTGTCTCTACCCTG ACACTGTCTAAGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCT TGTGAAGTCACCCACAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAG TCATCAATCGGGGCGAGTGC</p>
23	Тяжелая цепь RB1+YTE	<p>EVQLVESGGGLVFRPGRSRLRSCTVSGFSFDDSAMSWVRQAPG KGLEWISFISKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQ MNSLKTЭДТАVYYCTRGAPYGGNSDYGLDVGQGTТТТVS SASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSL SLSFGK</p>

24	Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь RB1+YTE (кодон-оптимизированная)	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGCGCGGACTGGTCAGACCTGGCAGATCCCTGAGGCTCAGCTGTACCGTGAGCGGCTTCAGCTTCGACGACTCCGCCATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCAGCTTCATCAAGAGCAAAACCTATGGCGGAACCAAGGAATACGCCGCCCTCCGTGAAGGGCAGGTTCAACATTTCCAGGGACGACAGCAAGAACATCGCTTACCTCCAGATGAACCTCCCTCAAGACCGAGGATACCGCCGTGTATTATTGCACCAGAGGCGCCCCCTACGGCGGCAATTCGACTATTACTACGGCCTGGATGTCTGGGGCCAAGGCACAACAGTGACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGACCCAGCGTGTTCGCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGAGGAACAGCCGCCCTCGGCTGTGGGTGAAAGACTACTTCCCGAGCCTGTGACAGTCAGCTGGAATAGCGGCGCTGTGACCAGCGGCTCCACACCTTTCCCGCTGTCTGCAGAGCTCCGGCCTGTACAGCCTGTCTCCGTGGTCAACAGTGCCTCCTCCAGCCTGGGCACACAACTTACATCTGTAACTGAAACCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAGTGCGAACCCAAATCCTGTGACAAGCCACACATGCCCCCCCCTGCCCCGCCCTGAGCTGTGGGGCGCCCTCCCGTGTTCCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGATACCTGTATATACCAGAGAACCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTCGACCTCAGCCACGAAGATCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTATAACAGCACCTACAGGTGGTGTCCGCTGTACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGAAGGAGTACAATGTAAGGTCAGCAACAAAGCCCTGCCCGCTCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAAGCCAGCCAGAAACCCAGGTGTACACCTGCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACAGGTCTCCCTGACCTGCCTGTGAAAGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAAGCAACGGCCAGCCTGAGAACTACAAGACCCCTCCGTGCTCGACAGCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAACAAGCAACGTGTTCTCTTGCTCCGTGATGCACAGGCTCTGCACAACCACTATACCCAGAACTCCCTGAGCCTCAGCCCCGAAAATGA</p>
25	Легкая цепь RB1+YTE	<p>DIQMTQSPFSLASVGDRTITCRISQDVRGALAWYQQKPKGAPKLLIFDASSLETGVPVSRFSGSGSTVFTLTISLQPEDFAAYYCQQFLDFPFTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>
26	Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь RB1+YTE	<p>GACATTCAGATGACTCAGTCCCTTCAAGTCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTACCATCACATGCCGGACCCAGGATGTGGGGCGCCCTGGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTTTGACGCTAGCTCCCTGGAGACCGCGTGCCTCCAGGTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGTTTCAACCTGACAATCTTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTGGCGCTTACTATTGCCAGCAGTTCCTGGATTTCCTTACCTTGGCCAAGGCACACGGCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTATCTTCCCCCTTCTGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCTAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGACGTGGAAGGTGGATAACGCTCTCAGTCTGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCTAAGGATAGCACATATTCCTGTCTCTACCTGACACTGTCTAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTCAACCCAGGGGCTGAGTTCACCAAGTCAATCAATCGGGCGAGTGC</p>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с F-белком РСВ человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 варибельной области

тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, связывающееся с F-белком РСВ человека, содержащее легкую цепь иммуноглобулина и тяжелую цепь иммуноглобулина, выбранное из группы, состоящей из:

а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 8; и

б) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего варибельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 8, при этом любые вариации последовательностей имеют место в каркасных областях антитела.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с формой "до слияния" F-белка РСВ человека с величиной K_d от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET).

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-3, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, представляющее собой полноразмерное антитело, имеющее две легкие цепи и две тяжелые цепи, при этом каждая легкая цепь содержит варибельную область, содержащую SEQ ID NO: 8, и константную область легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO: 14); и каждая тяжелая цепь содержит варибельную область, содержащую SEQ ID NO: 7, и константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 13).

6. Выделенное антитело по п.4, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

7. Выделенное антитело по п.6, отличающееся тем, что аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 и аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, представляющее собой IgG антитело.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, представляющее собой антитело, продуцируемое в клетке CHO.

10. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7.

11. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.10.

12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8, и нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7.

13. Композиция для лечения или профилактики инфекции РСВ, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

14. Композиция по п.13, дополнительно содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, к патогену дыхательных путей, выбранному из вируса гриппа, цитомегаловируса человека (чЦМВ), метапневмовируса человека (чМПВ), вируса парагриппа человека (чПГВ), риновируса человека (чРВ), возбудителя микоплазменной пневмонии, возбудителя стрептококковой пневмонии, аденовируса, бокавируса, энтеровируса, норовируса или ВК-вируса.

15. Композиция по п.14, в которой патоген дыхательных путей представляет собой вирус гриппа, чЦМВ, чМПВ, чПГВ, норовирус или ВК-вирус.

16. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

а) культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов по пп.1-9, в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и

б) извлечение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или культураль-

ной среды.

17. Иммуногенная композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и антиген, выбранный из F-белка РСВ (слитого белка) и G-белка РСВ (белка прикрепления) и их фрагментов.

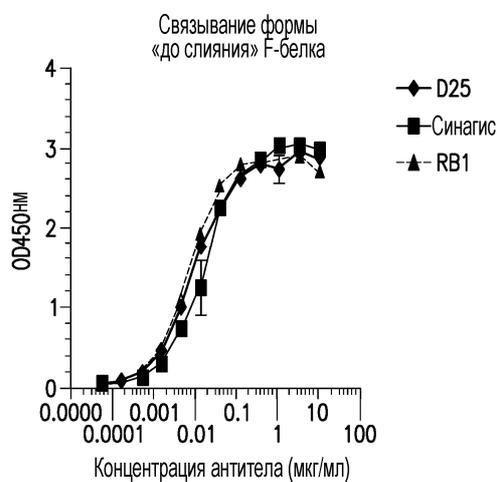
18. Способ обнаружения присутствия формы "до слияния" F-белка РСВ человека или его фрагмента в образце, включающий создание контакта образца с антителом или фрагментом по любому из пп.1-9 и обнаружение присутствия комплекса между антителом или фрагментом и пептидом; при этом обнаружение комплекса указывает на присутствие формы "до слияния" F-белка РСВ.

19. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 для получения лекарственного средства для:

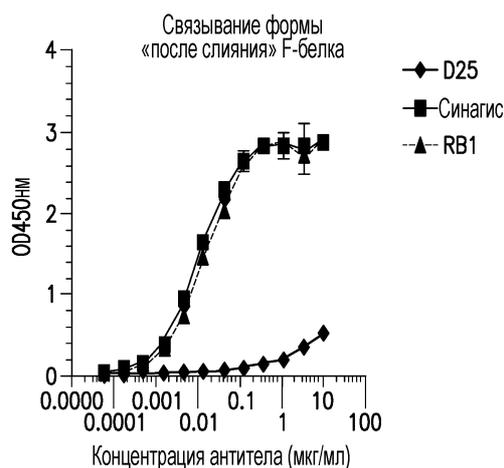
- a) профилактики или лечения инфекции или инфекционного заболевания или
- b) профилактики или лечения респираторных заболеваний и осложнений после трансплантации, связанных с инфекцией.

20. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по пп.1-9 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики РСВ инфекции.

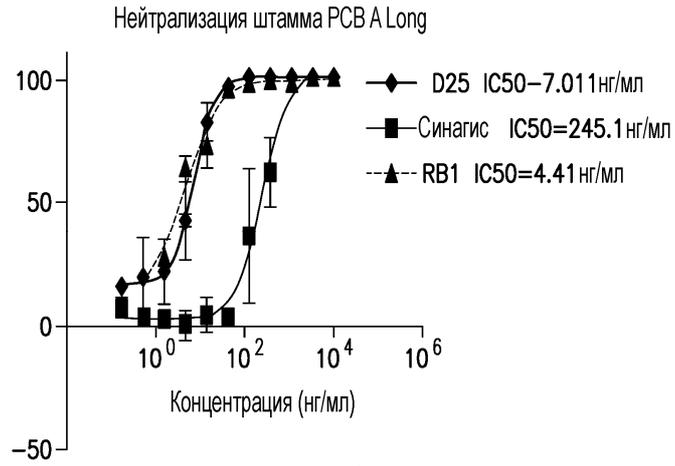
21. Применение композиции по пп.13-15 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики РСВ инфекции.



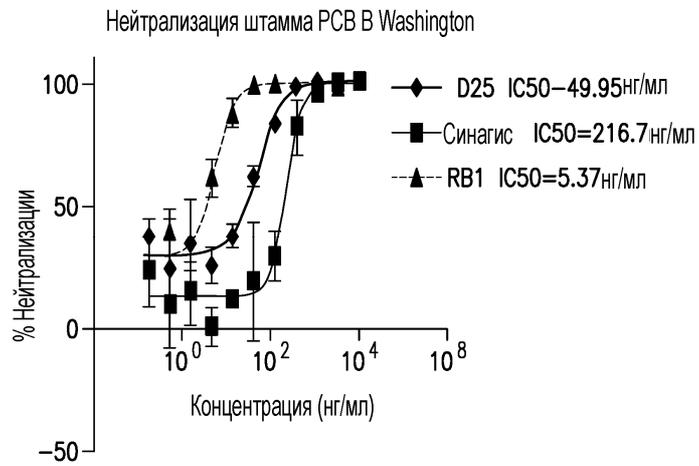
Фиг. 1А



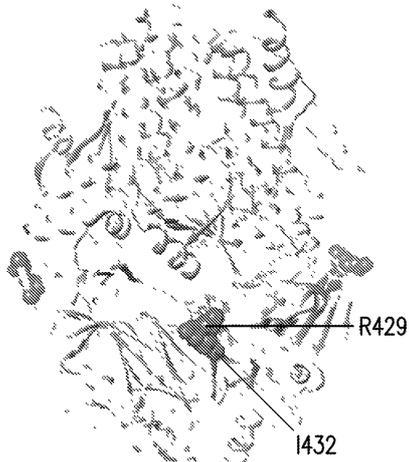
Фиг. 1В



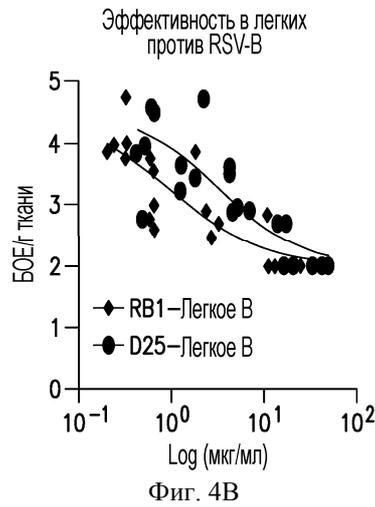
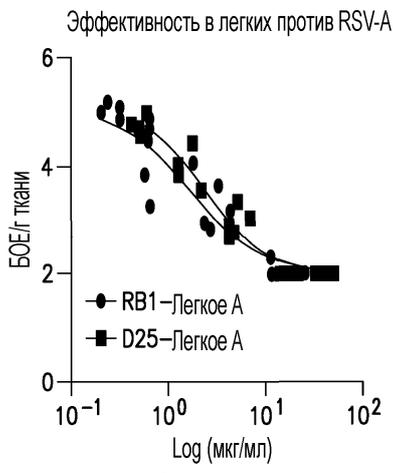
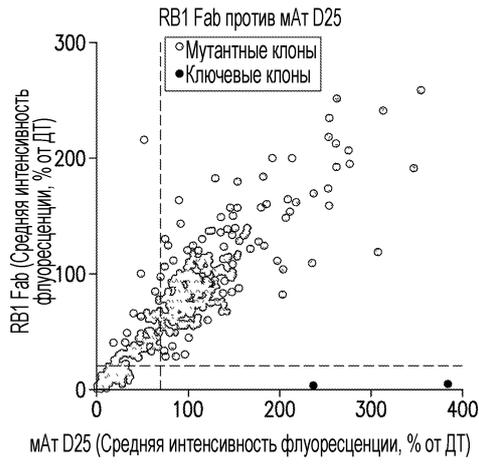
Фиг. 2А

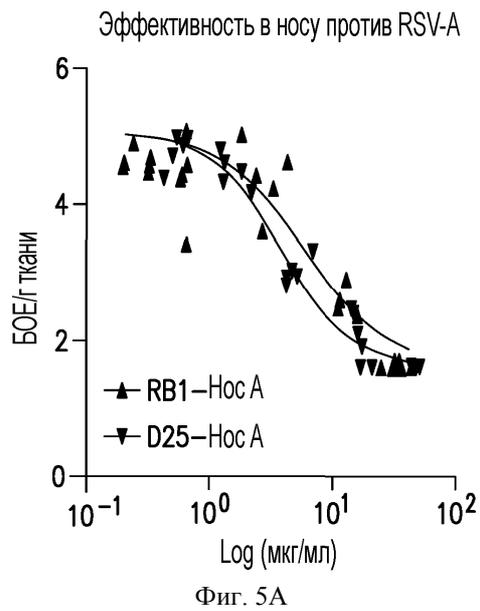
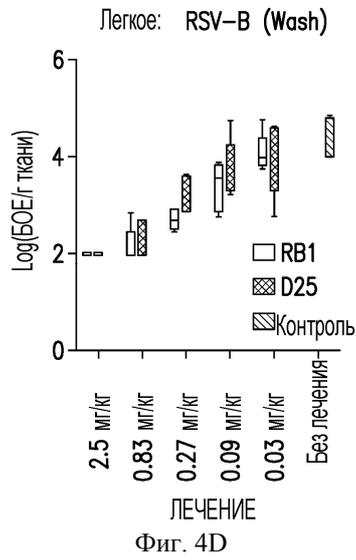
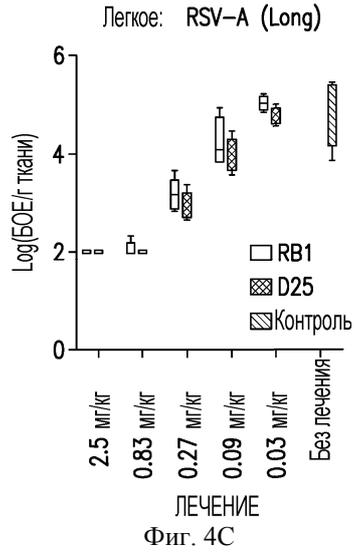


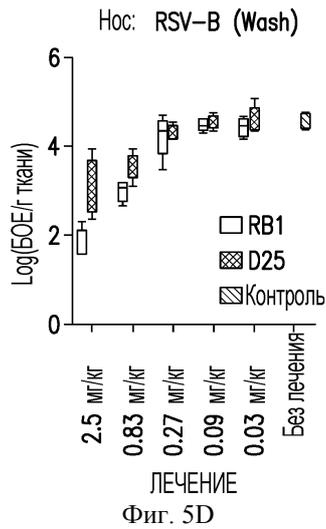
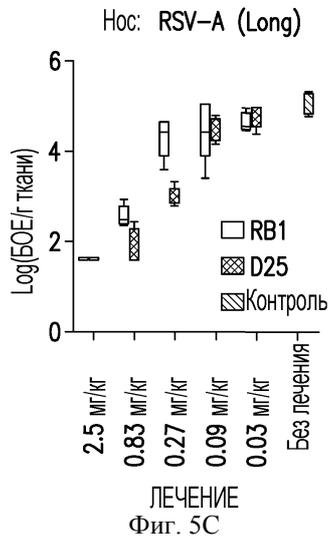
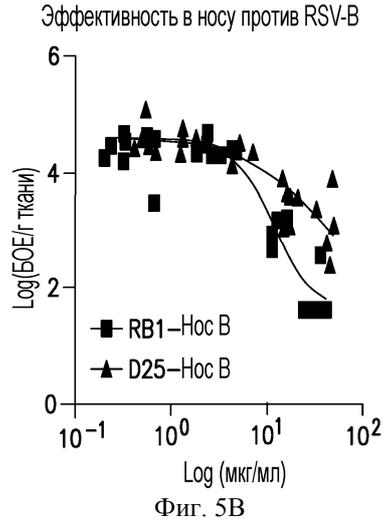
Фиг. 2В



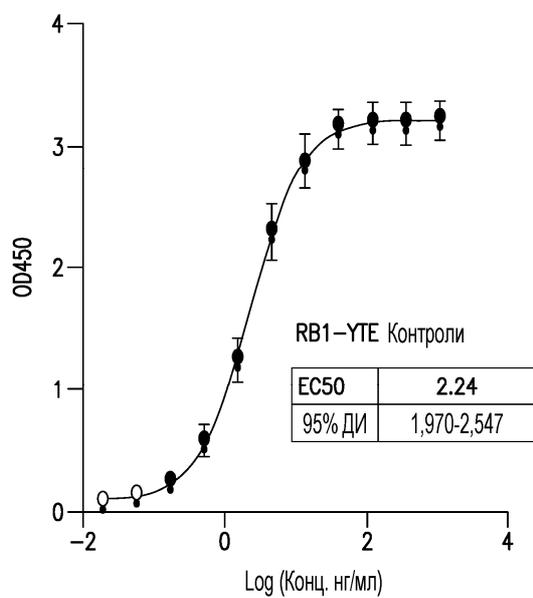
Фиг. 3А





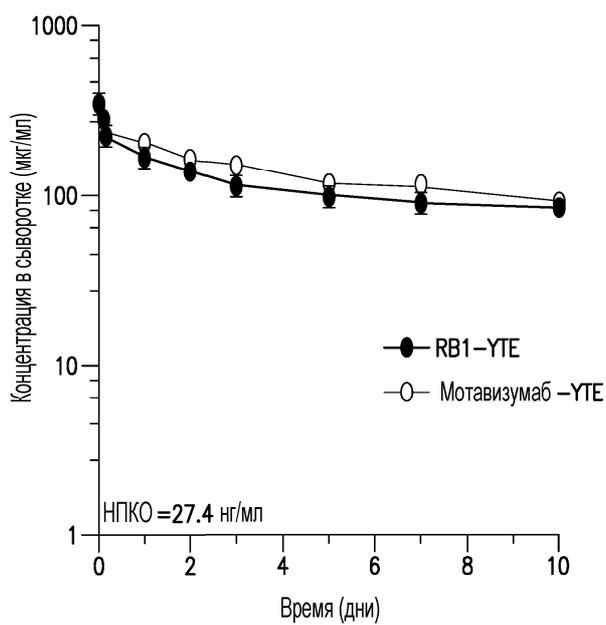


Связывание RB1-УТЕ с F-белком РСВА методом ELISA



Фиг. 6

15-M100-7265, ФК у макак-резусов, в/в 10 мг/кг



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2