

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092085** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.02.09

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.04

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ sPLA2-G1B И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **18305229.9**

(32) **2018.03.02**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/055255**

(87) **WO 2019/166665 2019.09.06**

(71) Заявитель:

ДИАККЮРАТ (FR)

(72) Изобретатель:

Тамарит Бланш, Тез Жак (FR)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается человеческих или гуманизованных антител, связывающих PLA2-G1B, их получения и их применения. Эти антитела проявляют полезные характеристики, в частности, для терапевтических и диагностических целей.

202092085
A1

202092085

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ sPLA2-G1B И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается антител, связывающих PLA2-G1B, их получения и их применения. Эти антитела проявляют полезные характеристики, в частности, для терапевтических и диагностических целей.

Уровень техники

Панкреатическая секретируемая фосфолипаза A2 из группы IB (PLA2-G1B) представляет собой низкомолекулярный (14 кДа), очень стабильный (7 дисульфидных связей) секретируемый белок, который катализирует гидролиз sn-2-жирноацильной связи фосфолипидов с высвобождением свободных жирных кислот и лизофосфолипидов (Lambeau & Gelb, 2008). У человека ген PLA2-G1B в основном экспрессируется в поджелудочной железе при меньших уровнях экспрессии в двенадцатиперстной кишке, тощей кишке и желудке (Eskola et al., 1983a; Nevalainen & Naaranen, 1993). Незначительная экспрессия описана в других тканях, таких как легкие, глаза (Kolko et al., 2007) и яички. В поджелудочной железе человека PLA2-G1B в основном синтезируется в апикальной части зимогеновых гранул ацинарных клеток поджелудочной железы (Eskola et al., 1983a). sPLA2-G1B также была обнаружена в инсулиновых секреторных гранулах островковых β -клеток поджелудочной железы и секретируется вместе с инсулином из островков при стимуляции глюкозой (Ramanadham et al., 1998). Фермент выделяется в панкреатический сок в виде неактивной про-формы и активируется при протеолитическом расщеплении пропептида с образованием зрелой секретируемой формы (sPLA2-G1B). Эксперименты *in vitro* свидетельствуют, что трипсин и плазмин способны активировать pro-sPLA2-G1B с хорошей эффективностью (Nakano et al., 1994).

Помимо роли в желудочно-кишечном тракте, PLA2-G1B также циркулирует в плазме человека (Nishijima et al., 1983; Eskola et al., 1983b; Sternby, 1984; Nevalainen et al., 1985; Kitagawa et al., 1991). Недавно было установлено, что PLA2-G1B играет решающую роль в механизме, лежащем в основе невосприимчивости Т-лимфоцитов CD4 у ВИЧ-инфицированных пациентов. В частности, было показано, что именно белок sPLA2-IB ответственен за хроническую инактивацию Т-лимфоцитов CD4, которая приводит их в аномальное состояние активации дифференцировки, что делает их невосприимчивыми к определенным физиологическим сигналам типа сигналов интерлейкина-7 (Theze Jacques et al., 2015).

Таким образом, существует потребность в антителах против PLA2-G1B, позволяющих ингибировать ферментативную активность PLA2-G1B.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены антитела против PLA2-GIB и способы их применения. В частности, изобретением предусмотрены терапевтические антитела против sPLA2-GIB человека, которые могут нейтрализовать ферментативную активность sPLA2-GIB.

В частности, объектом изобретения являются человеческие или гуманизованные антитела либо их производные, которые связываются с sPLA2-GIB человека.

Предпочтительно человеческие или гуманизованные антитела по изобретению связываются с эпитопом, включающим по меньшей мере один аминокислотный остаток из числа W3, R6, K7, K10, C77, Y75, G79 и S80 sPLA2-GIB человека. Более предпочтительно антитела по изобретению являются нейтрализующими антителами. Конкретными примерами таких антител являются антитела #2B, #2B1 и #2B2.

Другим объектом изобретения являются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела либо их производные, как определено выше, или же их легкие или тяжелые цепи либо вариабельные домены.

Изобретением также предусмотрены векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, как определено выше, а также рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие такой вектор или молекулу нуклеиновой кислоты.

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие: (i) антитело или его производное, нуклеиновую кислоту, вектор или рекомбинантные клетки-хозяева, как определено выше, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Изобретением также предусмотрены антитела либо их производные, нуклеиновые кислоты, векторы, рекомбинантные клетки-хозяева или композиции, как определено выше, для применения в качестве лекарственных средств, в особенности при лечении иммунных заболеваний, у нуждающихся в этом субъектов.

Изобретением также предусмотрен способ лечения нуждающихся в этом субъектов, в особенности субъектов с иммунными заболеваниями, который включает введение субъектам антител либо их производных, нуклеиновых кислот, векторов, рекомбинантных клеток хозяина или композиций, как определено выше.

Следующим объектом изобретения является способ получения антител, как определено выше, включающий культивирование клеток, как определено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антител, и необязательно выделение данных антител.

Терапевтические антитела по изобретению могут применяться у любых

млекопитающих, особенно у нуждающихся в этом людей. Они подходят для ингибирования PLA2-GIB и коррекции любых заболеваний, связанных с нежелательной активностью данного белка.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Свойства моноклонального антитела 14G9. А. Ингибирование ферментативной активности sPLA2-GIB. В. Кривые разведения при непрямом методе ELISA. С. Кривые разведения при конкурентном методе ELISA.

Фиг. 2. Ингибирование моноклональным антителом 14G9 ингибирующего действия плазмы, выделенной от инфицированных ВИЧ-1 пациентов, на ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 от одного здорового донора. Не наблюдалось никакого эффекта при использовании изотипного контрольного mAb.

Фиг. 3. Ингибирование моноклональным антителом 14G9 при 10 мкг ингибирующего действия плазмы, выделенной от инфицированных ВИЧ-1 пациентов, на ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-лимфоцитах CD4 от 5 различных здоровых доноров. Не наблюдалось никакого эффекта при использовании 10 мкг изотипного контрольного mAb или неингибирующего mAb # 6F7.

Фиг. 4. Ингибирование *in vivo* моноклональным антителом 14G9 при 1 мг ингибирующего действия 100 мкг sPLA2-GIB на ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4, выделенных из спленоцитов мышей. Не наблюдалось значительного эффекта при введении 900 мкг изотипного контрольного mAb.

Фиг. 5. Оценка сродства гуманизованных вариантов 14G9 конкурентным методом ELISA.

Фиг. 6. Нормализованная термическая денатурация гуманизованных антител #1A, #1B, #2A и #2B.

Фиг. 7. Анализ антитела #2B методом SEC. Верхняя панель: SEC-хроматограмма #2B. Средняя панель: базовая линия при увеличении. Нижняя панель: базовая линия при увеличении с привязкой пиков.

Фиг. 8. Нормализованная термическая денатурация гуманизованных антител #2B1 и #2B2.

Фиг. 9. Анализ методом проточной цитометрии связывания мономерного IgG гуманизованных антител #2B, #2B1 и #2B2 с FcγR человека.

Фиг. 10. Анализ методом проточной цитометрии связывания иммунных комплексов #2B с FcγR человека.

Фиг. 11. Анализ методом проточной цитометрии остаточного связывания антигена на сенсibilизированных антителами клетках гуманизованных антител #2B, #2B1 и #2B2 с

FcγR человека.

Фиг. 12. Кристаллическая структура комплекса Fab#2B2/sPLA2-IB. Остовы sPLA2-GIB выделены серым и пурпурным цветом, легкая цепь Fab #2B2 – светло-голубым и розовым, а тяжелая цепь Fab #2B2 – зеленым и желтым (А). Нековалентные связи в комплексе Fab#2B2/sPLA2-GIB, остов sPLA2-GIB выделен желтым цветом, легкая цепь Fab #2B2 – голубым, а тяжелая цепь Fab #2B2 – зеленым (В).

Фиг.13. Ингибирование антителом 14G9 или #2B ингибирующего действия sPLA2-GIB (А) или плазмы, выделенной от инфицированных ВИЧ-1 пациентов (В), на ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 от одного здорового донора.

Фиг. 14. Ингибирование *in vivo* антителом #2B2 при 1 или 2 мг ингибирующего действия 100 мкг sPLA2-GIB на ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4, выделенных из спленоцитов мышей. Не наблюдалось значительного эффекта при введении 1 мг изотипного контрольного mAb.

Таблица 1. Степень идентичности между V-генами мыши либо их гуманизованными версиями и гаметной вариабельной областью человека, используемой в качестве акцепторных последовательностей.

Таблица 2. Подробная информация о различиях в последовательности между V-генами гуманизованных версий и соответствующими гаметными последовательностями человека.

Таблица 3. Ингибирование ферментативной активности sPLA2-GIB гуманизованными антителами. Результаты выражены в % от контроля.

Таблица 4. Оценка IC₅₀ у различных гуманизованных антител конкурентным методом ELISA в отношении рекомбинантного sPLA2-GIB человека и рекомбинантного pro-sPLA2-GIB человека.

Таблица 5. Дифференциальная сканирующая калориметрия гуманизованных антител. T_m – температура денатурации/плавления; T_{onset} – температура, при которой начинается переход к разупорядочению; T_½ – ширина перехода на половине высоты пика; ΔH – калориметрическая энтальпия разупорядочения, отражающая нарушение внутримолекулярных взаимодействий у белка; общая площадь – это полная энтальпия разупорядочения (общая площадь под термограммой), отражающая термодинамическую стабильность.

Таблица 6. Анализ методом SEC-HPLC гуманизованных антител #1A, #1B, #2A и #2B.

Таблица 7. Определение K_D в отношении рекомбинантного sPLA2-GIB человека и рекомбинантного pro-sPLA2-GIB человека методом поверхностного плазмонного

резонанса у гуманизованных антител #2B, #2B1 и #2B2.

Таблица 8. Дифференциальная сканирующая калориметрия гуманизованных антител #2B1 и #2B2. T_m – температура денатурации/плавления; T_{onset} – температура, при которой начинается переход к разупорядочению; $T_{1/2}$ – ширина перехода на половине высоты пика; ΔH – калориметрическая энтальпия разупорядочения, отражающая нарушение внутримолекулярных взаимодействий у белка; общая площадь – это полная энтальпия разупорядочения (общая площадь под термограммой), отражающая термодинамическую стабильность.

Таблица 9. Анализ методом SEC-HPLC гуманизованных антител #2B1 и #2B2.

Таблица 10. Анализ методом визуализованного капиллярного изоэлектрического фокусирования (iCIEF) гуманизованных антител #2B, #2B1 и #2B2. Представлены средние кажущиеся значения pI для вариантов с различным зарядом в образцах.

Раскрытие сущности изобретения

Антитела

Настоящее изобретение основывается на создании новых человеческих и гуманизованных антител, которые терапевтически применимы для эффективного и селективного модулирования активности PLA2-GIB у человека.

В настоящем изобретении термин “PLA2-GIB” обозначает панкреатическую фосфолипазу A2 из группы IB. PLA2-GIB была идентифицирована и клонирована из различных видов млекопитающих. Белок PLA2-GIB человека описан, к примеру, в Lambeau and Gelb (2008). Последовательность доступна по номеру Genbank No. NP_000919.

Аминокислотная последовательность типичной PLA2-GIB человека представлена ниже (SEQ ID NO: 1):

**MKLLVLAVLL TVAAADSGIS PRAVWQFRKM IKCVIPGSDP FLEYNNYGCY
CGLGGSGTPV DELDKCCQTH DNCYDQAKKL DSCCKFLDNP YTHTYSYSCS
GSAITCSSKN KECEAFICNC DRNAAICFSK APYNKANKNL DTKKYCQS.**

Аминокислоты 1-15 по SEQ ID NO: 1 (подчеркнуты) представляют сигнальную последовательность, а аминокислоты 16-22 по SEQ ID NO: 1 (выделены жирным шрифтом) – последовательность пропептида.

В контексте изобретения термин “PLA2-GIB” предпочтительно обозначает PLA2-GIB человека.

Белок PLA2-GIB человека может находиться в двух различных формах: неактивная про-форма (pro-sPLA2-GIB), которая активируется при протеолитическом расщеплении пропептида, образуя зрелую секретлируемую форму (sPLA2-GIB). Термин PLA2-GIB

охватывает любые формы белка типа про-формы и/или зрелой формы. Как правило, зрелая секретируемая форма включает последовательность из аминокислотных остатков 23-148 по SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 14) или любые ее природные варианты типа вариантов, полученных в результате полиморфизма или сплайсинга.

SEQ ID NO: 14:

AVWQFRKMIK CVIPGSDPFL EYNNYGCYCG LGGSGTPVDE LDKCCQTHDN
CYDQAKKLDK CKFLLDNPYT HTYSYSCSGS AITCSSKNKE CEAFICNCDR
NAAICFSKAP YNКАНKNLDT KKYCQS.

Термин “pro-sPLA2-GIB” или “proPLA2-GIB” предпочтительно обозначает белок, содержащий последовательность из аминокислотных остатков 16-148 по SEQ ID NO: 1 или любые её природные варианты типа вариантов, полученных в результате полиморфизма или сплайсинга.

Заявитель получил несколько моноклональных антител против sPLA2-GIB. Он обнаружил, что одно из них, антитело #14G9, проявляет замечательную нейтрализующую активность и избирательно в отношении sPLA2-GIB. Заявитель также охарактеризовал это моноклональное антитело, его вариабельные области, а также его эпитоп. В частности, как показано в экспериментальном разделе, антитело 14G9 связывает эпитоп, содержащий аминокислотные остатки W3, R6, K7, K10, C77, Y75, G79 и S80 sPLA2-GIB человека по SEQ ID NO: 14. Заявитель также смог получить гуманизованные антитела на основе 14G9 и продемонстрировать их замечательную активность *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, изобретением предусмотрены выделенные человеческие или гуманизованные антитела против PLA2-GIB.

Более конкретно, изобретением предусмотрены выделенные человеческие или гуманизованные антитела, которые избирательно связываются с и нейтрализуют PLA2-GIB человека.

“Гуманизированные” формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальные последовательности, происходящие не из иммуноглобулина человека, привитые в человеческий каркас (например, константный домен цепей антител человека). По большей части гуманизованные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентные антитела), в которых остатки из гипервариабельных участков реципиента заменены остатками из гипервариабельных участков (донорского антитела) не человека, а таких видов, как мыши, крысы, кролики или приматы, обладающих требуемой специфичностью, сродством и емкостью. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются в реципиентном антителе или в донорском

антителе. Эти модификации делаются для дальнейшего улучшения характеристик антител. В общем, гуманизованное антитело включает практически всё из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все гиперпеременные участки соответствуют таковым у иммуноглобулина не человека, а все или практически все участки FR происходят из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованные антитела необязательно также содержат хотя бы часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека (Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)).

“Человеческое антитело” представляет собой антитело, аминокислотная последовательность которого соответствует таковой у антитела, вырабатываемого человеком и/или полученного любым из изложенных здесь методов получения человеческих антител. Человеческие антитела могут быть получены различными методами, известными в данной области, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Также для получения человеческих моноклональных антител доступны методы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенным животным, которые были модифицированы для выработки таких антител в ответ на введение антигена, но эндогенные локусы которых были отключены и заменены локусами человека, например, иммунизированным ксеномышам (например, см. U.S. Pat. Nos. 6,075,181 и 6,150,584 на счет технологии Xenomouse™). Также см., к примеру, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) на счет человеческих антител, получаемых по технологии В-клеточной гибридомы человека.

Антитела по изобретению могут быть поликлональными, моноклональными или их производными, сохраняющими такую же антигенную специфичность, такими, например, как гуманизованные нанотела или scFv. Антитела по изобретению предпочтительно представляют собой моноклональные антитела, то есть антитела, каждое из которых направлено против одного антигенного сайта. Моноклональные антитела по настоящему изобретению могут быть получены способами, которые известны *per se* в данной области типа метода гибридом, впервые описанного Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), или методами рекомбинантной ДНК. Их также можно выделить из фаговых библиотек антител по методике, описанной, к примеру, в Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) и

Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

В частности, изобретением предусмотрены человеческие или гуманизованные моноклональные антитела, которые избирательно связываются и нейтрализуют PLA2-GIB человека.

В предпочтительных воплощениях антитела по изобретению представляют собой гуманизованные моноклональные антитела.

В более предпочтительном воплощении изобретения предусмотрены человеческие или гуманизованные моноклональные антитела, которые связываются с sPLA2-GIB человека, предпочтительно с эпитопом, содержащим по меньшей мере один аминокислотный остаток из числа W3, R6, K7, K10, C77, Y75, G79 и S80 sPLA2-GIB человека (по SEQ ID NO: 14), более предпочтительно с эпитопом, содержащим по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 аминокислотных остатка из числа W3, R6, K7, K10, C77, Y75, G79 и S80 sPLA2-GIB человека, еще более предпочтительно с эпитопом, содержащим по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7 аминокислотных остатков из числа W3, R6, K7, K10, C77, Y75, G79 и S80 sPLA2-GIB человека. В изобретении представлены антитела, которые связывают такие остатки, проявляют сильную нейтрализующую активность и представляют ценные терапевтические средства для ингибирования PLA2-GIB человека *in vivo*.

В одном конкретном воплощении антитела либо их производные по изобретению конкурентно ингибируют связывание моноклонального антитела 14G9 с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело 14G9 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 2, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 3.

В другом конкретном воплощении антитела либо их производные по изобретению конкурентно ингибируют связывание моноклонального антитела #2B с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело #2B содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 5.

В другом конкретном воплощении антитела либо их производные по изобретению конкурентно ингибируют связывание моноклонального антитела #2B1 с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело #2B1 содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 6.

В другом конкретном воплощении антитела либо их производные по изобретению конкурентно ингибируют связывание моноклонального антитела #2B2 с sPLA2-GIB

человека, причем данное моноклональное антитело #2B2 содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7.

Термин “конкурентно ингибирует” означает, что антитело может снижать, ингибировать или вытеснять связывание контрольного антитела с sPLA2-G1B. Анализ конкуренции может проводиться по стандартным методикам, таким, к примеру, как конкурентный метод ELISA или другие анализы связывания. Как правило, анализ конкурентного связывания включает очищенный целевой антиген, обычно связанный либо с твердым субстратом, либо с клетками, немеченое исследуемое антитело и меченое контрольное антитело. Конкурентное ингибирование измеряется путем определения количества меченого антитела, связавшегося в присутствии исследуемого антитела. Обычно исследуемое антитело присутствует в избытке типа в 5-500 раз больше контрольного антитела. Обычно для ELISA исследуемое антитело находится в 100-кратном избытке, а для ферментативных методов – в 10-кратном избытке. Когда исследуемое антитело, присутствующее в избытке, ингибирует или вытесняет по меньшей мере 70% связывания контрольного антитела с антигеном, то это считается конкурентным ингибированием данного контрольного антитела. В одном конкретном воплощении, когда исследуемое антитело, присутствующее в 100-кратном избытке, ингибирует или вытесняет по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80% связывания контрольного антитела с антигеном при ELISA, то это считается конкурентным ингибированием данного контрольного антитела. Предпочтительно конкурирующие антитела связываются с эпитопами, имеющими общие аминокислотные остатки.

В одном конкретном воплощении изобретения предусмотрены моноклональные антитела, содержащие:

(i) переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и FR-L, причем CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3 состоят или в основном состоят из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно, переменной области легкой цепи по SEQ ID NO: 2, а FR-L представляет собой последовательность иммуноглобулина человека; и

(ii) переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 и FR-H, причем CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3 состоят или в основном состоят из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, переменной области тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3, а FR-H представляет собой последовательность иммуноглобулина человека.

“Переменная область” антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи (“V_H” или “V_L”), которые содержат антигенсвязывающие сайты.

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи (V_L или V_H) обычно состоит из каркасной области (“FR”), прерываемой тремя гипервариабельными участками, которые именуются “определяющими комплементарность участками” или “CDR”. Пределы каркасной области и участков CDR были точно установлены, например, по Kabat (см. “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)) и по Chothia.

Обращаясь к SEQ ID NO: 2, три участка CDR соответствуют следующим аминокислотным остаткам:

CDR-L1: аминокислотные остатки QDVSTA,

CDR-L2: аминокислотные остатки WAS,

CDR-L3: аминокислотные остатки QQDYSTPPT.

Обращаясь к SEQ ID NO: 3, три участка CDR соответствуют следующим аминокислотным остаткам:

CDR-H1: аминокислотные остатки GYTFTNYW,

CDR-H2: аминокислотные остатки IDPSDTRT,

CDR-H3: аминокислотные остатки ARQTLYYEALDY.

В одном конкретном воплощении изобретения предусмотрены моноклональные антитела, выбранные из:

– моноклональных антител, содержащих легкую цепь, включающую, в основном состоящую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую, в основном состоящую или состоящую из SEQ ID NO: 5 (клон #2B);

– моноклональных антител, содержащих легкую цепь, включающую, в основном состоящую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую, в основном состоящую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (клон #2B1);

– моноклональных антител, содержащих легкую цепь, включающую, в основном состоящую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую, в основном состоящую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (клон #2B2); и

– их производных.

Термин “производное антитела” в настоящем изобретении означает такое антитело, которое сохраняет антигенную специфичность контрольного антитела, но при этом один или несколько аминокислотных остатков модифицированы (химически или биологически) для улучшения его свойств.

Примеры таких химических модификаций включают, например, алкилирование, ПЭгилирование, ацилирование, образование сложных эфиров или амидов и т.п. В частности, производным является такое антитело, описанное здесь, которое

модифицировано так, что оно содержит один или несколько дополнительных небелковых молекул типа водорастворимых полимеров. Примеры водорастворимых полимеров включают, без ограничения, ПЭГ, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана и поливинилового спирта.

Производные также могут создаваться для повышения или уменьшения степени гликозилирования антител. Добавление или удаление сайтов гликозилирования у антител удобно проводить путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы образовался или удалялся один или несколько сайтов гликозилирования. Если антитело содержит Fc-область, то можно изменить присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, вырабатываемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленные двухлучевые олигосахариды, которые обычно присоединяется N-связью к Asn²⁹⁷ домена C_H2 области Fc (например, см. Wright et al., TIBTECH, 1997, 15: 26-32). Олигосахариды могут включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в “стволе” раздвоенной структуры олигосахаридов. В некоторых воплощениях модификации олигосахаридов у антител по изобретению могут проводиться для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В одном воплощении производные содержат модифицированную Fc-область для изменения ADCC (посредством модуляции связывания с FcγRIII).

В одном воплощении предусмотрены варианты антител, в углеводной структуре которых отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таких антителах может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Содержание фукозы определяют путем вычисления среднего количества фукозы в цепи сахара у Asn²⁹⁷ относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn²⁹⁷ (например, сложных, гибридных и структур с высоким содержанием маннозы), при измерении методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Asn²⁹⁷ означает остаток аспарагина, расположенный в положении 297 в Fc-области (при нумерации EU остатков Fc-области); однако Asn²⁹⁷ также может находиться примерно на ± 3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. Примеры публикаций, относящихся к “дефукозилированным” или “дефектным по фукозе” вариантам антител, включают, без ограничения, Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004) и Yamane-Ohnuki N, Satoh M., mAbs 2009, 1:230-236. Примеры клеточных линий, способных вырабатывать дефукозилированные антитела, включают клетки CHO Led 3, дефектные по фукозилированию белка (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545

(1986)), и линии клеток с нокаутом типа клеток CHO с нокаутом гена α -1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (например, см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 94(4): 680-688 (2006)).

В некоторых воплощениях может потребоваться создать антитела со встроенным цистеином, например, “тиоMAb”, в которых один или несколько остатков антитела заменены на остатки цистеина. В определенных воплощениях заменяемые остатки находятся в доступных сайтах антитела. При замене этих остатков цистеином реактивные тиоловые группы тем самым размещаются в доступных сайтах антитела и могут использоваться для конъюгирования антитела с другими молекулами типа молекул лекарственных средств или молекул типа линкер-препарат, образуя иммуноконъюгаты, как описано здесь далее. В некоторых воплощениях можно заменять на цистеин любой один или несколько из следующих остатков: V205 (нумерация по Кабату) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи. Антитела со встроенным цистеином могут быть получены, как описано, например, в U.S. Patent No. 7,521,541.

Термин “производное” также включает иммуноконъюгаты, содержащие антитела против sPLA2-GIB, как определено выше, конъюгированные с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая, без ограничения, цитотоксические средства, детектируемые молекулы типа флуоресцентных молекул, диагностические радиоизотопы или средства визуализации; или же с твердой основой типа агарозных шариков и т.п. Примеры цитотоксических средств включают, без ограничения, химиотерапевтические средства или препараты, средства, ингибирующие рост, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения либо их фрагменты) или радиоактивные изотопы. Конъюгаты антител и цитотоксических средств могут быть получены с помощью различных бифункциональных конъюгирующих белки реагентов, хорошо известных специалистам. Линкер может быть “расщепляемым линкером”, облегчающим высвобождение цитотоксического препарата в клетки. Например, можно использовать кислотолабильные линкеры, чувствительные к пептидазам линкеры, фотоллабильные линкеры, диметилвые линкеры или содержащие дисульфиды линкеры (Chari et al., *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992)). Производные также могут представлять собой биспецифичные антитела.

Антитела по изобретению обычно являются “выделенными”, например, были отделены по меньшей мере от одного компонента своего естественного окружения. В частности, антитела могут быть очищены до степени, большей, например, чем по меньшей

мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% при определении, к примеру, методами электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрического фокусирования (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографическими методами (например, ионообменной или обратнофазовой HPLC). Для обзора методов оценки чистоты антител см., например, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Как изложено выше, антитела по изобретению в основном являются нейтрализующими антителами, то есть они способны по крайней мере частично ингибировать активность PLA2-GIB.

sPLA2-GIB катализирует гидролиз sn-2-жирноацильной связи фосфолипидов с высвобождением свободных жирных кислот и лизофосфолипидов. Определенные антитела по изобретению ингибируют ферментативную активность sPLA2-GIB типа гидролиза sn-2-жирноацильной связи фосфолипидов. Методы проверки такого свойства изложены подробно в экспериментальном разделе.

Другие конкретные антитела по изобретению ингибируют связывание sPLA2-GIB с её субстратом.

Другие конкретные антитела по изобретению ингибируют опосредованное sPLA2-GIB ингибирование индуцируемой IL-7 ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4. Методы проверки такого свойства изложены подробно в экспериментальном разделе.

Нейтрализующая активность антител или производных может быть определена *in vitro* или *in vivo*, например, по связыванию или биологическими методами типа тестов, описанных в экспериментальном разделе. Ингибирование/нейтрализация может быть полным или частичным. В частности, антитела могут ингибировать исследуемую активность на 10% или больше, предпочтительно на 20% или больше, 30% или больше, 40% или больше, 50% или больше.

В предпочтительных воплощениях антитела представляют собой IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Предпочтительно антитела избирательно связываются с sPLA2-GIB, т.е. проявляют предпочтительное связывание с sPLA2-GIB по сравнению с другими молекулами. Избирательность можно определить конкурентным методом ELISA или на Вiasoge. Отличие по сродству/авидности, которым отмечается избирательность, может составлять любое измеримое значение, как-то, например, соотношение более 1:1.1 или более чем 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 или больше.

Антитела либо их производные по изобретению можно выделять и хранить с

использованием стандартных способов и сред. Их можно лиофилизировать. Также их можно замораживать.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантное получение

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела по изобретению либо их легкие или тяжелые цепи либо их переменные домены, или же нуклеиновой кислоты, комплементарной данной кодирующей последовательности. Предпочтительно нуклеиновая кислота представляет собой выделенную или очищенную нуклеиновую кислоту.

Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (кДНК или гДНК), РНК или их смесь. Она может быть в одноцепочечной форме, в дуплексной форме или в виде их смеси. Она может включать модифицированные нуклеотиды, содержащие, к примеру, модифицированную связь, модифицированное пуриновое или пиримидиновое основание или модифицированный сахар. Она может быть получена любым способом, известным специалистам в данной области, включая химический синтез, рекомбинацию и мутагенез. Нуклеиновая кислота по изобретению может быть выведена из последовательности антитела по изобретению, а употребление кодонов можно адаптировать в соответствии с теми клетками, в которых должна транскрибироваться нуклеиновая кислота. Эти операции могут выполняться в соответствии с методами, хорошо известными специалистам в данной области, некоторые из которых описаны в справочном руководстве Sambrook et al. (Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third edition, Cold Spring Harbor).

Нуклеиновая кислота по изобретению может кодировать аминокислотную последовательность, включающую легкую цепь, и/или аминокислотную последовательность, включающую тяжелую цепь антитела, или же она может быть комплементарна такой кодирующей последовательности.

Конкретные примеры таких последовательностей нуклеиновых кислот включают последовательности, приведенные в виде SEQ ID NOs: 10-13.

Настоящим изобретением также предусмотрены векторы, содержащие нуклеиновую кислоту по изобретению. Необязательно вектор может содержать несколько нуклеиновых кислот по изобретению. В частности, вектор может содержать нуклеиновую кислоту по изобретению, функционально связанную с регуляторным участком, то есть участком, содержащим одну или несколько контрольных последовательностей. Необязательно вектор может содержать несколько нуклеиновых кислот по изобретению, функционально связанных с несколькими регуляторными участками.

Термин “контрольная последовательность” означает последовательность

нуклеиновой кислоты, необходимую для экспрессии кодирующей области. Контрольные последовательности могут быть эндогенными или гетерологичными. Предпочтительны хорошо известные контрольные последовательности, которые используются в настоящее время специалистами в данной области. Такие контрольные последовательности включают, без ограничения, промоторы, последовательности сигнальных пептидов и терминаторы транскрипции.

Термин “функционально связанный” означает такую конфигурацию, в которой контролирующая последовательность находится в соответствующем положении относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы контролирующая последовательность направляла экспрессию кодирующей области.

Настоящим изобретением также предусмотрено применение нуклеиновых кислот или векторов по изобретению для трансформации, трансфекции или трансдукции клеток хозяина.

Настоящим изобретением также предусмотрены клетки-хозяева, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот по изобретению и/или один или несколько векторов по изобретению.

Термин “клетка-хозяин” охватывает и любых потомков исходной клетки-хозяина, которые не идентичны исходным клеткам-хозяевам вследствие мутаций, происходящих во время репликации.

Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают описанные здесь прокариотические или эукариотические клетки.

Например, антитела могут вырабатываться в бактериях, в частности, когда не требуется гликозилирование и эффекторная функция Fc. Насчет экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, U.S. Patent Nos. 5,648,237, 5,789,199 и 5,840,523 (также см. Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003, pp. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии можно выделить антитела из лизата бактериальных клеток в растворимой фракции и подвергнуть дальнейшей очистке.

Наряду с прокариотами, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих антитела векторов являются эукариотические микроорганизмы типа мицелиальных грибов или дрожжей, включая штаммы грибов и дрожжей, у которых были “гуманизированы” пути гликозилирования, в результате чего получают антитела с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004); и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител также происходят из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многие штаммы бакуловирусов, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Также в качестве хозяев можно использовать культуры растительных клеток. Например, см. US Patent Nos. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 и 6,417,429.

В качестве хозяина также можно использовать клетки позвоночных. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другие примеры полезных линий клеток-хозяев из млекопитающих: почечные клетки CV1 обезьяны, трансформированные SV40 (COS-7); эмбриональные почечные клетки человека (клетки 293, описанные, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, описанные, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собаки (MDCK); клетки печени крыс Buffalo (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, в Mather et al., *Annals NY Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичников китайского хомячка (CHO), включая клетки CHO DHFR⁻ (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); и линии клеток миеломы типа Y0, NS0 и Sp2/0. Насчет обзора по некоторым линиям клеток-хозяев из млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Настоящим изобретением также предусмотрен способ получения антител по изобретению, включающий культивирование клеток хозяина, содержащих нуклеиновую кислоту по изобретению или вектор по изобретению, как предусмотрено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антител, и необязательно извлечение антител из клеток хозяина либо из среды для культивирования клеток хозяина. Необязательно, полученные антитела могут быть дополнительно очищены или выделены. Подходящие среды, условия культивирования и способы получения хорошо известны специалистам и легко могут быть выбраны в соответствии с клетками хозяина и получаемыми антителами.

Фармацевтические композиции

Настоящим изобретением также предусмотрены фармацевтические композиции,

содержащие антитела, нуклеиновые кислоты, векторы или клетки-хозяева по изобретению. Композиции могут содержать одно или несколько антител по изобретению, одну или несколько нуклеиновых кислот по изобретению и/или один или несколько векторов по изобретению и/или одну или несколько клеток-хозяев по изобретению. Предпочтительно фармацевтические композиции содержат одно или несколько антител по изобретению.

Фармацевтические композиции, содержащие антитела по изобретению, могут быть составлены известными способами для получения фармацевтически полезных композиций, при этом антитело требуемой степени чистоты смешивают с необязательными физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition (2000)) в виде водных растворов, лиофилизированных или других высушенных составов.

В настоящем изобретении термин “фармацевтический состав” или “фармацевтическая композиция” означает препарат, который находится в такой форме, которая делает эффективной биологическую активность активного ингредиента, и не содержит таких дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для тех субъектов, которым будет вводиться препарат. Предпочтительно, такие составы являются стерильными, т.е. асептическими или свободными от всех живых микроорганизмов и их спор.

Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, без ограничения, буферные вещества, стабилизирующие вещества, консерванты, средства поддержания изотоничности, неионные детергенты, антиоксиданты и различные другие добавки.

Буферные вещества способствуют поддержанию pH в диапазоне, приближающемся к физиологическим условиям. Они предпочтительно присутствуют в концентрации от 1 mM до 50 mM. Подходящие буферные вещества для применения в настоящем изобретении включают, без ограничения, как органические, так и неорганические кислоты и их соли типа цитратного, сукцинатного, тартратного, фумаратного, глюконатного, оксалатного, лактатного и ацетатного буфера, а также фосфатные буферы, гистидиновые буферы и соли триметиламина типа трис.

Консерванты добавляют для замедления роста микробов, их можно добавлять в количестве от 0,2% до 1% (вес/об). Подходящие консерванты для применения в настоящем изобретении включают, без ограничения, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; мета-крезол; такие алкилпарабены, как метил- или пропилпарабен; октадецилдиметилбензиламмония хлорид, галогениды бензалкония (например, хлорид,

бромид, йодид); гексаметония или бензетония хлорид; катехол; резорцинол; циклогексанол; и 3-пентанол.

Средства поддержания изотоничности добавляют для обеспечения изотоничности жидких композиций по настоящему изобретению, они включают многоатомные сахароспирты, предпочтительно трехатомные или высшие сахароспирты, такие как глицерин, эритритол, арабитол, ксилитол, сорбитол и маннитол.

Стабилизирующие вещества относятся к широкой категории эксципиентов, функция которых может варьироваться от наполнителя до добавки, которая солюбилизирует терапевтическое средство или помогает предотвратить денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Типичными стабилизаторами являются многоатомные сахароспирты (перечисленные выше); такие аминокислоты, как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.п., органические сахара или сахароспирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннитол, сорбитол, ксилитол, рибитол, миоинозитол, галактитол, глицерин и т.п., включая циклические типа инозитола; полиэтиленгликоль; аминокислотные полимеры; серосодержащие восстановители, как-то мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (т.е. <10 остатков); такие белки, как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; такие гидрофильные полимеры, как моносахариды поливинилпирролидона типа ксилозы, маннозы, фруктозы, глюкозы; такие дисахариды, как лактоза, мальтоза, сахароза и трисахариды типа рафинозы; такие полисахариды, как декстран. Стабилизаторы могут присутствовать в пределах от 0,1 до 10 000 массовых долей на 1 массовую долю терапевтического средства.

Неионные поверхностно-активные вещества (ПАВ) или детергенты (также известные как “смачивающие средства”) добавляют для солюбилизации терапевтического средства, а также для защиты терапевтического белка от агрегации при перемешивании. Подходящие неионные ПАВ включают, без ограничения, полисорбаты (20, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), Pluronic™, полиолы, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (Tween™-20, Tween™-80 и т.д.). Неионные ПАВ могут присутствовать в пределах от 0,05 мг/мл до 1,0 мг/мл, предпочтительно от 0,07 мг/мл до 0,2 мг/мл.

Различные другие эксципиенты включают, без ограничения, наполнители (например, крахмал), хелатирующие средства (например, EDTA), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метионин, витамин E) и соразтворители.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, к примеру, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы доставки лекарств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) либо в макроэмульсии. Такие методы изложены в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition (2000).

Формы фармацевтических композиций, способы введения, дозировки и режимы зависят от подлежащего лечению заболевания, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента и т.п.

Вводимые дозы можно адаптировать в зависимости от различных параметров, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или же от требуемой продолжительности лечения.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть составлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и т.п.

Предпочтительно фармацевтический препарат такой, который можно вводить посредством инъекции. В частности, это могут быть изотонические, стерильные, солевые растворы (мононатрий- или динатрийфосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п. или же смеси таких солей) либо сухие, особенно лиофилизированные композиции, из которых, в зависимости от случая, при добавлении стерилизованной воды или физиологического раствора можно приготовить растворы для инъекций.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем внесения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, как потребуются, с последующей стерилизацией фильтрованием. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными методами приготовления являются методы вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым другим желательным ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Наряду с композициями, составленными для парентерального введения типа внутривенной или внутримышечной инъекции, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые формы для перорального приема; капсулы с замедленным высвобождением; и другие формы, используемые в настоящее время.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать одно или несколько антител по изобретению.

Фармацевтические композиции также могут содержать одно или несколько других активных соединений. Примеры дополнительных активных соединений включают, без ограничения, химиотерапевтические препараты, антибиотики, противопаразитарные средства, противогрибковые средства или противовирусные средства.

Количество антител по изобретению, которое будет эффективным при лечении конкретного заболевания или состояния, будет зависеть от характера заболевания или состояния и может быть определено стандартными клиническими методами.

В предпочтительном воплощении каждая доза может составлять от 0,1 мг до 25 мг антитела на 1 килограмм веса тела или, более предпочтительно, от 1 мг до 10 мг на 1 килограмм веса тела.

Схема дозирования для введения может варьироваться от одного раза в месяц до ежедневного в зависимости от ряда клинических факторов, включая тип заболевания, тяжесть заболевания и чувствительность субъекта к терапевтическому средству.

Терапевтические применения

Настоящим изобретением также предусмотрены антитела, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева или фармацевтические композиции по изобретению для применения в качестве лекарственных средств, в частности, для профилактики или лечения заболеваний, связанных с sPLA₂-GIB.

Настоящим изобретением также предусмотрено применение антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток хозяина или фармацевтических композиций по изобретению в качестве лекарственных средств для лечения заболеваний. Изобретением также предусмотрено применение антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток хозяина или фармацевтических композиций по изобретению для изготовления или приготовления лекарственных средств для лечения заболеваний у субъектов.

В частности, настоящим изобретением предусмотрен способ лечения заболеваний у субъектов, включающий введение нуждающимся в этом субъектам эффективного количества антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток хозяина или композиций по изобретению.

В настоящем изобретении термин “субъект” или “пациент” относится к любым млекопитающим, предпочтительно человеку.

Эффективное количество может означать терапевтически или профилактически эффективное количество. “Терапевтически эффективное количество” означает такое количество, которое, при необходимых дозировках и периодах времени, эффективно для

достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антител или композиций по изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как само заболевание, возраст, пол и вес индивида, а также способность антитела или композиции вызвать требуемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество охватывает и такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами. “Профилактически эффективное количество” означает такое количество, которое, при необходимых дозировках и периодах времени, эффективно для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактические дозы применяются у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, то профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Изобретение может применяться для предотвращения или лечения любых заболеваний или расстройств, связанных с некоторой степенью нежелательной активности PLA2-GIB.

В одном конкретном воплощении изобретение может применяться для предотвращения или лечения любых заболеваний, связанных с ненадлежащими (например, дефектными или неправильными) иммунными ответами, в частности с ненадлежащей активностью Т-клеток CD4, а также любых заболеваний, при которых усиление иммунитета может улучшить состояние субъекта. Эти заболевания иногда называют “иммунными нарушениями” или “иммунодефицитами” в настоящей заявке. Это включает конкретные случаи иммунодефицита, вызванные вирусной инфекцией или патогенной инфекцией либо раком.

В настоящем изобретении термин “лечение” или “лечить” относится, например, к любым клиническим вмешательствам в попытке изменить естественное течение заболевания у индивида и может проводиться с профилактической либо с лечебной целью. Желательные эффекты лечения включают, без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление степени заболевания и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых воплощениях композиции и способы по изобретению применяются для замедления развития заболевания или нарушения либо для замедления прогрессирования заболевания или нарушения.

Примерами заболеваний, которым может пойти на пользу такое лечение, являются

все заболевания с иммунодефицитом типа иммунодефицита при ВИЧ. В этом отношении, в одном конкретном воплощении изобретения предусмотрены способы лечения иммунодефицита или связанных с этим расстройств у нуждающихся в этом субъектов, включающие введение данным субъектам антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток хозяина или композиций, как определено выше.

В другом конкретном воплощении изобретения предусмотрены антитела, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева или композиции, как определено выше, для применения при лечении иммунодефицита или связанных с этим расстройств у нуждающихся в этом субъектов.

Иммунодефицитные состояния и связанные с ними расстройства означают любые состояния или патологии, характеризующиеся и/или вызванные снижением иммунной функции или ответа у субъектов. Иммунодефицитные состояния могут быть вызваны, например, вирусными инфекциями (например, ВИЧ, гепатит В и т.п.), бактериальными инфекциями, раком или другими патологическими состояниями. Термин “связанное с иммунодефицитом расстройство” означает любое заболевание, вызванное иммунодефицитом или связанное с ним. Изобретение особенно подходит для лечения иммунодефицитов, связанных с Т-клетками CD4, и связанных с этим заболеваний.

В одном конкретном воплощении изобретения предусмотрены способы лечения ВИЧ-инфекций у субъектов путем введения данным субъектам антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток хозяина или композиций, как определено выше. В некоторых воплощениях субъектами являются пациенты на ранней стадии ВИЧ-инфекции, и данные способы приводят к повышению вероятности того, что пациент контролирует ВИЧ. В некоторых воплощениях субъектами являются пациенты со слабым восстановлением иммунитета после антиретровирусной терапии и/или с тяжелой идиопатической Т-лимфопенией CD4 (ICL). Изобретением также предусмотрен способ повышения активности Т-клеток CD4 у ВИЧ-инфицированных субъектов путем введения данным субъектам соединения формулы А.

Изобретение может применяться для лечения субъектов на ранней стадии инфекции для предотвращения или снижения частоты, степени или продолжительности иммунодефицита. Как правило, их можно вводить сразу же после выявления инфекционного заболевания и до появления клинических признаков. На очень ранней стадии ВИЧ-инфекции изобретение может привести пациентов к состоянию контроля ВИЧ. Изобретение также может применяться на более поздней стадии у инфицированных субъектов по отдельности либо в комбинации с противовирусными средствами. При таком режиме изобретение может ускорить восстановление Т-

лимфоцитов CD4 и восстановление их функций. Соответственно, в одном конкретном воплощении изобретения предусмотрено одновременное, раздельное или последовательное введение субъектам с вирусной инфекцией (i) противовирусного средства и (ii) антитела, нуклеиновой кислоты, вектора, клеток хозяина или композиции, как определено выше. Такой протокол особенно подходит для лечения ВИЧ-инфицированных субъектов, причем антитела по изобретению применяются в комбинации с антиретровирусной терапией (например, HAART), что позволяет уменьшить HAART или даже по крайней мере временно прервать терапию HAART, которая известна своими тяжелыми пагубными последствиями.

Изобретением также предусмотрены способы лечения рака у субъектов путем усиления иммунитета, включающие введение данным субъектам антител, нуклеиновой кислоты, вектора, клеток хозяина или композиции, как определено выше. Изобретением также предусмотрены способы лечения связанного с Т-клетками CD4 иммунодефицита у субъектов в связи с раком путем введения данным субъектам антител, нуклеиновой кислоты, вектора, клеток хозяина или композиции, как определено выше.

Антитела по изобретению (и любые дополнительные терапевтические средства) можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, а если нужно для местного лечения, и внутриочаговое введение. Парентеральное введение включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим способом, например, посредством инъекций типа внутривенных или подкожных инъекций, отчасти в зависимости от того, будет ли введение краткосрочным или хроническим. При этом предусмотрены различные схемы дозирования, включая, без ограничения, однократное или многократное введение в различные моменты времени, введение болюсом и периодическое вливание.

Следующие примеры приводятся для иллюстрации, а не для ограничения.

Примеры

Пример 1. Получение и характеристика антитела 14G9 против sPLA2-G1B

1.1. Получение mAb #14G9

Вкратце, мышей иммунизировали рекомбинантным sPLA2-G1B человека и проверяли полученные mAb на их ингибирующую способность и соответствующее сродство к sPLA2-G1B в сравнении с pro-sPLA2-G1B.

1.2. Характеристика mAb #14G9

1.2.1. Сродство по конкурентному методу ELISA

Измеряли сродство связывания антител с pro-sPLA2-1B и sPLA2-1B методом

конкурентного иммуноанализа на планшетах. Вкратце, для конкурентного метода ELISA сначала смешивали постоянные количества антител на разных уровнях с серийными разведениями антигенного белка, sPLA2-IB или pro-sPLA2-IB человека, в диапазоне от 0 до 10 мкг/мл и инкубировали 2 часа при комнатной температуре для достижения псевдоравновесного связывания между антителом и антигеном. Затем эти растворы переносили в предварительно покрытые sPLA2-IB или pro-sPLA2-IB 96-луночные планшеты с тем, чтобы свободные антитела в смеси связывались с покрывающим планшеты sPLA2-IB или pro-sPLA2-IB. Планшеты обычно покрывали при от 30 до 100 нг белка sPLA2-IB или pro-sPLA2-IB человека в растворе PBS в течение ночи при 4°C, после чего блокировали неспецифическим BSA. После отмывки избытка антител в растворе выявляли связанные с планшетом антитела с помощью конъюгированного с HRP козьего поликлонального антитела против IgG или IgA мыши и проявляли с помощью колориметрического субстрата. Анализировали зависимость сигналов от концентрации антигена в растворе по 4 параметрам с помощью программного обеспечения Prism™ (GraphPad) и выражали в виде IC₅₀.

1.2.2. Определение сродства по SPR

Определяли константы сродства (K_D) при связывании pro-sPLA2-IB и sPLA2-IB с антителом #14G9 по поверхностной кинетике методом поверхностного плазмонного резонанса с биосенсором в реальном времени (BIAcore™). Более конкретно, сродство антитела к pro-sPLA2-IB и sPLA2-IB человека измеряли на приборе BIAcore® 2000. Антитело фиксировали на поверхности с антителом против IgG мыши и подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантного белка pro-sPLA2-IB или sPLA2-IB. Проводили кинетический анализ с помощью программного обеспечения BIAevaluation™, получая константы скорости ассоциации и диссоциации.

1.2.3. Определение специфичности непрямой методом ELISA

Лунки микропланшета обычно покрывали по 100 нг рекомбинантного sPLA2-X, sPLA2-IB или pro-sPLA2-IB человека в PBS pH 7,5 в течение ночи при 4°C. Лунки с образцами трижды отмывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20. После последней отмывки лунки с образцами обрабатывали блокирующим раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в буфере PBS, в течение 60 мин при комнатной температуре. После промывки PBS, содержащим 0,05% Tween 20, в лунки, покрытые антигеном, добавляли возрастающие количества (от 10 нг/мл до 3 мкг/мл) mAb #14G9 и инкубировали 120 мин при комнатной температуре. После отмывки PBS, содержащим 0,05% Tween 20, выявляли связывание mAb #14G9 с помощью конъюгированного с HRP козьего поликлонального антитела против IgG или IgA мыши и проявляли с помощью

колориметрического субстрата. Анализировали зависимость сигналов от концентрации антигена в растворе по 4 параметрам с помощью программного обеспечения Prism™ (GraphPad) и выражали в виде EC₅₀.

1.2.4. Ингибирование ферментативной активности sPLA2-IB

Ингибирование mAb #14G9 ферментативной активности sPLA2-IB тестировали по опубликованной методике (Rouault et al., 2007). Вкратце, рекомбинантный sPLA2-IB человека (0,1 нМ) инкубировали с возрастающими количествами (0,1, 0,3, 1 и 3 мкг) очищенной кроличьей поликлональной иммунной сыворотки против sPLA2-IB человека или очищенного антитела #14G9 в течение 30 мин при 37°C. Затем измеряли ферментативную активность sPLA2, используя помеченные [³H]-олеатом автоклавированные мембраны *E. coli* в качестве фосфолипидного субстрата в буфере для активности sPLA2. Реакции останавливали добавлением 300 мкл стоп-буфера, а затем центрифугировали смеси при 10000 g в течение 5 мин и просчитывали радиоактивность высвободившегося [³H]олеата в супернатантах.

Результаты проверяли с помощью коммерческого набора для флуориметрического анализа ферментативной активности. Рекомбинантный sPLA2-IB человека (3 нМ) инкубировали с возрастающими количествами очищенного mAb #14G9 в течение 120 мин при комнатной температуре, а затем измеряли ферментативную активность sPLA2 избирательным флуориметрическим методом (AteroDX® sPLA2 Activity, Aterovax Paris, Франция). Результаты выражали в единицах на мл образца (ед./мл), где одна единица определяется как количество фермента sPLA2, которое катализирует высвобождение 1 нмоль продукта за одну минуту. Предел обнаружения метода составляет 17 ед./мл при верхнем диапазоне линейности анализа в 232 ед./мл и функциональной чувствительности (20%) 21 ед./мл. Средняя вариабельность внутри цикла и средняя вариабельность между анализами: 5,9% и 8,9%, соответственно. Результаты обоих методов анализировали по 4 параметрам с помощью программного обеспечения Prism™ (GraphPad) и выражали в виде IC₅₀.

1.3. Действие mAb #14G9 in vitro на индуцированную IL-7 ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4

1.3.1. Индуцированная IL-7 ядерная транслокация фосфо-STAT5

Выделяли клетки CD4 человека с помощью набора RosetteSep (Stemcell Technologies, #15062). Т-клетки CD4 ресуспендировали при концентрации 10⁶ клеток/мл в среде RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Бельгия) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (FBS), 50 мМ HEPES pH 7,4, глутамина, пенициллина, стрептомицина и фунгизона (полная среда) и уравнивали не менее 2 ч при 37°C в увлажненной

атмосфере с 5% CO₂.

Ядерную транслокацию pSTAT5 отслеживали методом конфокальной микроскопии. После уравнивания иммобилизованные клетки высевали на покрытые полилизинном предметные стекла, после чего активировали 15 мин при 2 нМ IL-7. Клетки фиксировали в 4% PFA в течение 15 мин при 37°C, а затем 15 мин при комнатной температуре и пермеабелизировали в 90% растворе метанол/вода при -20°C. Затем выявляли pSTAT5 путем окрашивания с помощью кроличьего антитела к pSTAT5 (CST, #9359), меченного ослиным антителом против кролика с AlexaFluor 555 (Life Technologies, #A31572). Для Т-лимфоцитов CD4 человека окрашивали клетки с помощью мышинового антитела против CD4 человека (eBioscience, #14-0042-82), меченного козьим антителом против мыши с AlexaFluor 488 (Life Technologies, #A11029). Для Т-лимфоцитов CD4 мыши окрашивали клетки с помощью крысиного антитела против CD4 мыши (eBioscience, #14-0042-85), меченного куриным антителом против крыс с AlexaFluor 488 (Life Technologies, #A21470). Получали снимки выше дифракционного предела на инвертированном лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (LSM700, Zeiss) с водно-иммерсионным апохроматическим объективом 40x/1.2 NA (Zeiss) или масляно-иммерсионным планохроматическим объективом 63x/1.4 NA (Zeiss). Изображения получали и анализировали с помощью программного обеспечения ZEN (Zeiss).

1.3.2. Действие mAb #14G9 *in vitro* на ингибирование положительной по ВИЧ-1 плазмой индуцированной IL-7 ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 человека

Для эксперимента типа доза-ответ возрастающие количества mAb #14G9 или mAb такого же изотипа сначала инкубировали 25 мин при комнатной температуре, а затем 5 мин при 37°C вместе с рекомбинантным sPLA2-IB или человеческой плазмой от одного положительного по ВИЧ-1 пациента (разведение 3% об/об в PBS). Затем уравновешенную смесь добавляли к Т-клеткам CD4, выделенным от одного здорового донора, и анализировали ядерную транслокацию фосфо-STAT5 методом конфокальной микроскопии, как описано выше. Для эксперимента с однократной дозой 10 мкг (конечная концентрация) mAb #14G9, неингибирующего mAb #6F7 или изотипного контрольного mAb сначала инкубировали 25 мин при комнатной температуре, а затем 5 мин при 37°C вместе с человеческой плазмой от 5 различных положительных по ВИЧ-1 пациентов (разведение 3% об/об в PBS). Затем уравновешенную смесь добавляли к Т-клеткам CD4, выделенным от одного здорового донора, и анализировали ядерную транслокацию фосфо-STAT5 методом конфокальной микроскопии, как описано выше.

1.4. Нейтрализующее действие mAb #14G9 *in vivo* на ингибирование sPLA2-G1B индуцированной IL-7 ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4

30 самок мышей C57BL/6J SOPF (Charles River Laboratories) содержали в индивидуально вентилируемых клетках в условиях SOPF со стерильной пищей и подачей воды *ad libitum*, при 12-часовом цикле день/ночь, и им давали освоиться в новом окружении за 5 дней до начала экспериментов. Все экспериментальные процедуры получили одобрение местного комитета по этике для животных (CETEA 89, Institut Pasteur de Paris). 30 животных разделяли на 6 экспериментальных групп (по 1 клетке на группу), которым вводили различные комбинации исследуемых препаратов путем внутривентриальной инъекции. Группа 1 получала 1 мг (300 мкл) изотипного контрольного mAb в T0, а затем 100 мкг (100 мкл) sPLA2-IB в T+2 ч, группа 2 получала 1 мг (300 мкл) mAb #14G9 в T0, а затем 100 мкг (100 мкл) sPLA2-IB в T+2 ч, группа 3 получала 100 мкг (100 мкл) sPLA2-G1B в T+2 ч, группа 4 получала инъекцию PBS (100 мкл) в T+2 ч, группа 5 получала инъекцию PBS (100 мкл) в T0, а группа 6 получала 100 мкг (100 мкл) sPLA2-G1B в T0. Мышей забивали путем смещения шейных позвонков в различные моменты времени после начала исследования. Группы с 1 по 4 забивали в T+5 ч, а группы 5 и 6 – в T+48ч. Сразу после забоя у животных извлекали селезенки и хранили при комнатной температуре в пробирках на 15 мл, содержащих 5 мл 5% RPMI, до дальнейшей обработки. Получали мышинные спленоциты с помощью диссоциатора GentleMACS (программа *m_spleen_01*), а затем выделяли клетки CD4 путем отрицательной селекции с помощью набора EasySep (Stemcell Technologies, #19851). Ядерную транслокацию фосфо-STAT5 анализировали методом конфокальной микроскопии, как описано выше. Для сравнения медиан между группами использовали критерий Mann-Whitney.

1.5. Последовательности mAb #14G9

Вариабельные области mAb #14G9 секвенировали в соответствии с классическими процедурами. Вкратце, из клеток гибридомы экстрагировали очищенную РНК и синтезировали комплементарную нить ДНК с помощью высокоточной обратной транскриптазы. Продукты ПЦР, полученные при высокоточной ПЦР с вырожденными праймерами, специфически нацеленными на кДНК, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь антител, секвенировали напрямую (секвенирование по двум цепям). Анализировали и собирали последовательности кДНК. Транслировали их в пептидные последовательности и проверяли в соответствии со структурой антител.

Пример 2. Гуманизация антитела #14G9

2.1. Стратегия гуманизации и получение гуманизованных вариантов #14G9

Мышиное антитело #14G9 гуманизировали путем пересадки трех участков CDR,

определенных по номенклатуре Кабата, из варибельной области легкой цепи (V_L) в гаметную V_L человека, которая была как можно более гомологична V_L мышинового антитела. Таким же образом пересаживали три участка CDR из варибельной области тяжелой цепи (V_H) в гаметную V_H человека, которая была как можно более гомологична V_H мышинового антитела. Кроме того, несколько аминокислотных остатков в каркасных участках выбранных гаметных варибельных областей человека заменяли на аминокислотные остатки, присутствующие в варибельных областях мыши (так называемые обратные мутации).

2.2. Ингибирование ферментативной активности sPLA2-G1B гуманизованными антителами

Ингибирование ферментативной активности sPLA2-G1B гуманизованными антителами #1A, #1B, #2A и #2B тестировали по опубликованной методике (Rouault et al., 2007). Вкратце, рекомбинантный sPLA2-1B человека (0,05 нМ) инкубировали с возрастающими количествами (0,1, 0,3, 1 и 3 мкг) очищенных антител в течение 30 мин при 37°C. Затем измеряли ферментативную активность sPLA2, используя помеченные [^3H]-олеатом автоклавированные мембраны *E. coli* в качестве фосфолипидного субстрата в буфере для активности sPLA2. Реакции останавливали добавлением 300 мкл стоп-буфера, а затем центрифугировали смеси при 10000 g в течение 5 мин и просчитывали радиоактивность высвободившегося [^3H]-олеата в супернатантах.

2.3. Определение сродства гуманизованных антител конкурентным методом ELISA

Измеряли сродство связывания гуманизованных антител с pro-sPLA2-G1B и sPLA2-G1B методом конкурентного иммуноанализа на планшетах. Вкратце, для конкурентного метода ELISA сначала смешивали постоянные количества антител на разных уровнях с серийными разведениями антигенного белка sPLA2-G1B или pro-sPLA2-G1B человека в диапазоне от 0 до 10 мкг/мл и инкубировали 2 часа при комнатной температуре для достижения псевдоравновесного связывания между антителом и антигеном. Затем эти растворы переносили в предварительно покрытые sPLA2-G1B или pro-sPLA2-G1B 96-луночные планшеты с тем, чтобы свободные антитела в смеси связывались с покрывающим планшеты sPLA2-G1B или pro-sPLA2-G1B. Планшеты обычно покрывали от 30 до 100 нг белка sPLA2-G1B или pro-sPLA2-G1B человека в растворе PBS в течение ночи при 4°C, после чего блокировали неспецифическим BSA. После отмывки избытка антител в растворе выявляли связавшиеся с планшетом антитела с помощью конъюгированного с HRP козьего поликлонального антитела против IgG или IgA мыши и проявляли с помощью колориметрического субстрата. Анализировали зависимость сигналов от концентрации антигена в растворе по 4 параметрам с помощью программного

обеспечения Prism™ (GraphPad) и выражали в виде IC₅₀.

2.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия гуманизованных антител

Сравнивали термостабильность антител #1А, #1В, #2А и #2В в буфере PBS методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) на установке Microcal VP-Capillary DSC. Все образцы перевозили в сухом льду и оттаивали путем инкубации в течение ночи при -20°C с последующей инкубацией на льду в течение 2 часов. После оттаивания все образцы центрифугировали (20000 g, 5 мин, 4°C) и определяли содержание белка на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 с программой анализа IgG перед анализом DSC. Время уравнивания составляло 3 мин, а последующие термограммы получали между 20 до 110°C при скорости сканирования 60°C/час, с периодом фильтрации 25 сек и умеренной обратной связью. Перед анализом образцов проводили 5 сканирований буфера для стабилизации прибора, и сканирование буфера повторяли между каждым сканированием белка в буфере.

2.5. Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC) гуманизованных антител

Аналитическую эксклюзионную хроматографию (SEC-HPLC) проводили на установке Shimadzu Prominence HPLC на колонке Superdex 200 increase 5/150 GL (GE Healthcare). Колонку предварительно уравнивали в PBS со скоростью 0,25 мл/мин, причем термостат колонки был настроен на 30°C. Все образцы центрифугировали (20000 g, 5 мин, 4°C) и определяли содержание белка на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 с программой анализа IgG перед анализом SEC. Изократическая программа была настроена на ввод 15 мкг каждого образца при 0,25 мл/мин в течение 18 мин. После анализа SEC из исходных данных выделяли хроматограмму при 280 нм и анализировали путем интегрирования пиков. Для калибровки колонки в тех же условиях и том же буфере, что и при анализе образцов, использовали серию белков из набора для калибровки молекулярного веса SEC фирмы GE Lifesciences. Использовались следующие белки: апротинин (6500 Да), рибонуклеаза А (13700 Да), карбоангидраза (29000 Да), овальбумин (44000 Да), кональбумин (75000 Да) и альдолаза (158000 Да). Для определения пустого объема колонки использовали голубой декстран. Калибровку колонки проводили в соответствии с инструкциями от набора для калибровки при гель-фильтрации (GE Lifesciences).

Пример 3. Характеристика антител #2В1 и #2В2

3.1. Определение сродства антител #2В, #2В1 и #2В2 по SPR

Определяли константы сродства (K_D) при связывании pro-sPLA2-GIB и sPLA2-GIB с антителами #2В, #2В1 и #2В2 по поверхностной кинетике методом поверхностного

плазмонного резонанса с биосенсором в реальном времени (BIAcore™). Более конкретно, сродство антител к pro-sPLA2-G1B и sPLA2-G1B человека измеряли на приборе BIAcore® 2000. Антитела фиксировали на поверхности с антителом против IgG мыши и подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантного белка pro-sPLA2-G1B или sPLA2-G1B. Проводили кинетический анализ с помощью программного обеспечения BIAevaluation™, получая константы скорости ассоциации и диссоциации.

3.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия гуманизованных антител #2B1 и #2B2

Сравнивали термостабильность антител #2B1 и #2B2 в буфере PBS методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), как описано выше.

3.3. Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC) гуманизованных антител #2B1 и #2B2

Проводили анализ антител #2B1 и #2B2 методом аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC-HPLC), как описано выше.

3.4. Анализ гуманизованных антител #2B1 и #2B2 методом капиллярного изоэлектрического фокусирования

Определяли изоэлектрические точки и относительное распределение вариантов с различным зарядом антител #2B, #2B1 и #2B2 методом визуализованного капиллярного изоэлектрического фокусирования (icIEF), используя Pharmalyte pH3-10 (широкий диапазон, подходящий для большинства mAb) в присутствии мочевины при конечной концентрации белка 0,2 мг/мл. Для калибровки использовали два маркера pI, охватывающие ожидаемые значения pI образцов. Считывание данных проводили по поглощению (при 280 нм) и выражали в виде электрофореграммы. Значения pI рассчитывали с помощью программ Compass и Empower 3, а интегрирование пиков – в Empower 3.

3.5. Связывание гуманизованных антител #2B, #2B1 и #2B2 с FcγR человека

Связывание мономерного IgG тестировали путем инкубации антител #2B, #2B1 и #2B2 (100 нг/мл) с 1×10^5 клеток CHO, стабильно экспрессирующих FcγR человека, в течение 30 мин на льду. Затем клетки отмывали, отделяли, фиксировали и анализировали методом проточной цитометрии (FACSCalibur; BD Biosciences). Связавшиеся mAb детектировали с помощью конъюгированного с PE козьего F(ab')₂-фрагмента против IgG человека в концентрации 0,5 мг/мл (Jackson Laboratories; кат. № 109-096-006).

Иммунные комплексы антитело-антиген получали путем совместной инкубации 10 мкг/мл гуманизованных антител и 5 мкг/мл sPLA2-G1B в течение 30 мин при 37°C. Затем иммунные комплексы инкубировали с 1×10^5 клеток CHO, стабильно экспрессирующих

Fc γ R человека, в течение 30 мин на льду. Затем клетки отмывали, отделяли, фиксировали и анализировали методом проточной цитометрии (FACSCalibur; BD Biosciences). Связавшиеся mAb детектировали с помощью конъюгированного с PE козьего F(ab')₂-фрагмента против IgG человека в концентрации 0,5 мг/мл (Jackson Laboratories; кат. № 109-096-006).

Остаточное связывание антигена на сенсibilизированных антителами клетках тестировали, сначала инкубируя антитела #2B, #2B1 и #2B2 (10 мкг/мл) с 1×10^5 клеток СНО, стабильно экспрессирующих Fc γ R человека, в течение 30 мин на льду. После отмывки добавляли биотинилированный антиген sPLA2-IB (5 мкг/мл) в течение 30 мин на льду. Затем клетки отмывали, отделяли, фиксировали и анализировали методом проточной цитометрии. Связавшийся биотинилированный антиген детектировали с помощью конъюгата авидин-FITC. Все данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа проточной цитометрии (FlowJo).

Пример 4. Биологические свойства гуманизованного антитела #2B2

4.1. Действие mAb #2B *in vitro* на индуцированную IL-7 ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4

Возрастающие количества антител #14G9 или #2B сначала инкубировали 25 мин при комнатной температуре, а затем 5 мин при 37°C вместе с 75 нМ рекомбинантным sPLA2-IB или человеческой плазмой от одного с положительного по ВИЧ-1 пациента (разведение 3% об/об в PBS). Затем уравновешенную смесь добавляли к Т-клеткам CD4, выделенным от одного здорового донора, и анализировали ядерную транслокацию фосфо-STAT5 методом конфокальной микроскопии, как описано выше. Дозозависимые кривые анализировали по 4 параметрам с помощью программного обеспечения Prism™ (GraphPad) и выражали в виде EC₅₀.

1.4. Нейтрализующее действие mAb #2B2 *in vivo* на ингибирование sPLA2-GIB индуцированной IL-7 ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4

Восемнадцать 7-недельных самцов мышей C57BL/6J SOPF (Charles River Laboratories) содержали в индивидуально вентилируемых клетках в условиях SOPF со стерильной пищей и подачей воды *ad libitum*, при 12-часовом цикле день/ночь, и им давали освоиться в новом окружении за 5 дней до начала экспериментов. Все экспериментальные процедуры получили одобрение местного комитета по этике для животных (CETEA 89, Institut Pasteur de Paris). 18 животных разделяли на 5 экспериментальных групп (по 1 клетке на группу), которым вводили различные комбинации исследуемых препаратов путем внутрибрюшинной инъекции. Группа 1 получала инъекцию PBS (350 мкл) в T0, а затем инъекцию PBS (100 мкл) в T+2 ч, группа 2

получала инъекцию PBS (350 мкл) в T₀, а затем 100 мкг (100 мкл) sPLA2-GIB в T+2 ч, группа 3 получала 2 мг изотипного контрольного mAb в T₀, а затем 100 мкг (100 мкл) sPLA2-GIB в T+2 ч, группа 4 получала 1 мг (350 мкл) гуманизованного mAb #2B2 в T₀, а затем 100 мкг (100 мкл) sPLA2-GIB в T+2 ч, группа 5 получала 2 мг (350 мкл) гуманизованного mAb #2B2 в T₀, а затем 100 мкг (100 мкл) sPLA2-GIB в T+2 ч. Мышей забивали путем смещения шейных позвонков в T+5 ч после начала исследования. Сразу после забоя у животных извлекали селезенки и немедленно подвергали обработке. Получали мышинные спленоциты с помощью диссоциатора GentleMACS, а затем выделяли клетки CD4 путем отрицательной селекции с помощью набора EasySep (Stemcell Technologies, #19851). Ядерную транслокацию фосфо-STAT5 анализировали методом конфокальной микроскопии, как описано выше. Для сравнения медиан между группами использовали критерий Mann-Whitney.

Результаты

Пример 5. Получение и характеристика антитела 14G9 против sPLA2-GIB

5.1. Получение и характеристика mAb #14G9

Вкратце, мышей иммунизировали рекомбинантным sPLA2-GIB человека и проверяли полученные mAb на их ингибирующую способность и соответствующее сродство к sPLA2-GIB в сравнении с pro-sPLA2-GIB. Было показано, что mAb #14G9 ингибирует ферментативную активность sPLA2-IB с расчетным EC₅₀ = 2,3 нМ (фиг. 1А) и является очень специфичным для sPLA2-GIB по сравнению с pro-sPLA2-GIB (фиг. 1В и 1С). При конкурентном методе ELISA значение IC₅₀ составляло 108,6 нМ и 1,0 нМ для pro-sPLA2-GIB и sPLA2-GIB, соответственно. Константу сродства (K_D) при связывании pro-sPLA2-GIB и sPLA2-GIB с #14G9 определяли по поверхностной кинетике методом поверхностного плазмонного резонанса с биосенсором в реальном времени (BIAcore™). В этих экспериментах значение K_D составляло 174 нМ и 0,34 нМ для pro-sPLA2-GIB и sPLA2-GIB, соответственно.

5.2. Действие mAb #14G9 in vitro на ингибирование плазмой инфицированных ВИЧ-1 пациентов индуцированной IL-7 ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4

Недавно было установлено, что фермент sPLA2-GIB играет решающую роль в механизме, лежащем в основе невосприимчивости Т-лимфоцитов CD4 у ВИЧ-инфицированных пациентов. В частности, было показано, что именно белок sPLA2-IB ответственен за хроническую инактивацию Т-лимфоцитов CD4, которая приводит их в аномальное состояние активации дифференцировки, что делает их невосприимчивыми к определенным физиологическим сигналам типа сигналов интерлейкина-7 (Theze Jacques et

al., 2015).

Способность mAb #14G9 противодействовать ингибирующему действию плазмы, выделенной от инфицированных ВИЧ-1 пациентов, на индуцированную IL-7 ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 тестировали путем инкубации плазмы, выделенной от инфицированных ВИЧ-1 пациентов, с mAb #14G9.

Как видно из фиг. 2, возрастающие количества mAb #14G9 приводили к дозозависимому восстановлению способности плазмы от вирусных пациентов ингибировать ядерную транслокацию фосфо-STAT5, индуцированную IL-7, в человеческих Т-клетках CD4, выделенных от одного здорового донора. Этот эффект восстановления доза-ответ не наблюдался с изотипным контрольным mAb. Эти результаты были воспроизведены в 5 последовательных экспериментах на Т-клетках CD4, выделенных от 5 различных здоровых доноров, при однократной дозе (10 мкг) mAb #14G9 или 10 мкг неингибирующего mAb #6F7 или изотипного контрольного mAb (фиг. 3).

5.3. Действие mAb #14G9 *in vivo* на ингибирование sPLA2-GIB ядерной транслокации фосфо-STAT5

Способность mAb #14G9 противодействовать *in vivo* ингибирующему действию введения sPLA2-GIB на индуцированную IL-7 ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 тестировали путем введения мышам сначала 1 мг mAb #14G9, а затем инъекции 100 мкг sPLA2-GIB. После этого анализировали ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4, выделенных из спленоцитов обработанных мышей, методом конфокальной микроскопии.

Как видно из фиг. 4, введение мышам 1 мг sPLA2-GIB приводило к 60%-му ингибированию ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4, выделенных из спленоцитов. Этот эффект полностью устранялся при предварительном введении 1 мг mAb #14G9, причем при контрольных инъекциях не наблюдалось значительного эффекта.

5.4. Последовательности переменных областей mAb #14G9

Секвенировали переменные области легких и тяжелых цепей mAb #14G9, которые представлены ниже.

>14G9-VL (SEQ ID NO: 8)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAACTCATGTCCACATCAGTAGGAGACA
GGGTCAG
CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAAGAAA
AAC
CAGGTCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCC
CT

AATCGCTTCACAGGCAGTAGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTG
CA

GGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTCAGCAAGATTATAGCACTCCTCCTACGTT
CG

GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC

>14G9-VL (SEQ ID NO: 2)

DIVMTQSHKLMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQEKPGQSPKLLIYWASTR
HTGVP

NRFTGSRSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQDYSTPPTFGAGTKLELKRADAAPT VSI

>14G9-VH (SEQ ID NO: 9)

CAGGTCCAACACTGCAACAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGCT

GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATACACTGGGTGAAGCG
GA

GGCCTGGACAAGGCCTTGAATGGATTGGTAATATTGACCCTTCTGATACTAGAACTC
AC

TACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGGCTGTAGACAAATCCTCCAGCAC
AGC

CTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTTTTACTGTGCAAG
AC

AGACCCTTACTATGAGGCCTTGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCT
CC TCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGG

>14G9-VH (SEQ ID NO: 3)

QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWVKRRPGQGLEWIGNIDPS
DTRTH

YNQKFKDKATLAVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVFYCARQTLYYEALDYWGQGTTLT
VS SAKTTPPSVYPL

У подавляющего большинства антител консервативный интерфейс V_H/V_L в основном состоит из гидрофобных взаимодействий между положениями H37, H45, H47, H89, H91, H100B и H103 по Kabat в каркасных остатках тяжелой цепи и L36, L44, L46, L87, L96 и L98 по Kabat в каркасных остатках легкой цепи и водородной связи между H39 и L38.

Поразительной и уникальной особенностью моноклонального антитела #14G9 является очень необычное присутствие Arg в положении H39 по Kabat и Glu в положении L38 по Kabat вместо обычного и очень консервативного Gln в обоих положениях. У

антитела 14G9 взаимодействие водородных связей между Gln H39 и Gln L38 заменено электростатическим притяжением между Arg H39 и Glu L38.

Пример 6. Гуманизация мышинового моноклонального антитела #14G9

6.1. Стратегия гуманизации и получение гуманизованных антител

Мышиное антитело #14G9 гуманизировали путем пересадки трех участков CDR, определенных по номенклатуре Kabat, из вариабельной области легкой цепи (V_L) в гаметную V_L человека, которая была как можно более гомологична V_L мышинового антитела. Таким же образом пересаживали три участка CDR из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) в гаметную V_H человека, которая была как можно более гомологична V_H мышинового антитела. Кроме того, несколько аминокислотных остатков в каркасных участках выбранных гаметных вариабельных областей человека заменяли на аминокислотные остатки, присутствующие в вариабельных областях мыши (так называемые обратные мутации). Исходя из информации о структуре вариабельных областей иммуноглобулина, было установлено, что эти несколько остатков в каркасных участках играют ключевую роль в поддержании правильной конформации CDR или в упаковке V_H/V_L , поэтому их сохранили в гуманизованных версиях А и В. Для разработки вариантов V_H #14G9 с пересадкой CDR были выбраны две гаметные линии человека, IGHV1-46*01 и IGHV5-10-1*01. Гаметная линия IGHV1-46*01 человека была выбрана потому, что она проявляет наибольшую идентичность по всему гену V с V_H 14G9 мыши на 66,3%. Гаметная линия IGHV5-10-1*01 человека была выбрана потому, что, хотя она имеет меньшую степень идентичности с V_H 14G9 (58,2%), но у неё другой профиль гомологии по всей V_H 14G9, чем у IGHV1-46*01. Для разработки вариантов V_L 14G9 с пересадкой CDR были выбраны две другие гаметные каппа-линии человека, IGKV1-39*01 и IGKV3-15*01. IGKV1-39*01 была выбрана потому, что она имеет наибольшую степень гомологии по всему гену V с V_L 14G9 мыши на 67,4%. IGKV3-15*01, несмотря на меньшую степень идентичности (62,1%), была выбрана потому, что она имеет другой профиль идентичности участков CDR с V_L #14G9, чем IGKV1-39*01.

При разработке гуманизованных вариантов учитывали необычное присутствие Arg H39 и Glu L38 на интерфейсе V_H/V_L . У варианта А последовательностей V_H и V_L с пересадкой CDR были сохранены исходные мышинные остатки в H39 (Arg) и L38 (Glu), соответственно. У варианта В исходные остатки в положениях H39 и L38 по Kabat были заменены на Gln (соответствующий гаметный остаток человека) с тем, чтобы воссоздать сильно консервативные взаимодействия водородных связей. Поэтому при разработке #14G9 с пересадкой CDR конструировали по 2 варианта (А и В) для каждой гаметной линии человека (2 для V_H и 2 для V_L). Вариант А содержит Arg H39 (V_H) или Glu L38 (V_L),

тогда как вариант В содержит Gln в обоих положениях. Гуманизованный вариант А V_H образует пару только с гуманизованным вариантом А V_L , и тот же принцип применяется к гуманизованному варианту В. Повышение степени идентичности последовательностей (то есть степени гуманизации) по всем генам V между гибридомой #14G9 мыши и вариантами с пересадкой CDR представлено в таблице 1. Различия в последовательностях гена V между гуманизованными вариантами и соответствующими гаметными переменными областями иммуноглобулина человека представлены подробно в таблице 2.

6.2. Ингибирование ферментативной активности sPLA2-GIB гуманизованными антителами

Способность различных гуманизованных антител ингибировать ферментативную активность sPLA2-GIB тестировали путем инкубации радиоактивно меченых мембран с рекомбинантным sPLA2-GIB человека в присутствии возрастающих количеств очищенных моноклональных антител. Результаты выражали в виде степени ингибирования ферментативной активности, наблюдаемой при наибольшей концентрации исследуемых mAb; они представлены в таблице 3. Как видно, mAb #2B ингибирует sPLA2-GIB сильнее всех.

6.3. Определение сродства гуманизованных антител конкурентным методом ELISA

Измеряли сродство связывания гуманизованных антител с pro-sPLA2-GIB человека и sPLA2-GIB человека, соответственно, методом конкурентного иммуноанализа на планшетах. Вкратце, сначала смешивали постоянные количества антител на разных уровнях с серийными разведениями антигенных белков для достижения псевдоравновесного связывания между антителом и антигеном. Затем эти растворы переносили в предварительно покрытые антигеном планшеты с тем, чтобы свободные антитела в смеси связывались с покрывающим планшет sPLA2-GIB или pro-sPLA2-GIB. Связавшиеся с планшетом антитела выявляли с помощью конъюгированных с HRP поликлональных антител. Примеры кривых титрования, полученных для различных вариантов, представлены на фиг. 5. Данные аппроксимировали по логистической модели нелинейной регрессии 4PL и определяли относительные значения IC_{50} по этой модели (таблица 4).

6.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия гуманизованных антител

Нормализованная термическая денатурация различных исследуемых антител представлена на фиг. 6, а параметры DSC – в таблице 5. T_m – температура денатурации/плавления; T_{onset} – температура, при которой начинается переход к разупорядочению; $T_{1/2}$ – ширина перехода на половине высоты пика; ΔH –

калориметрическая энтальпия разупорядочения, отражающая нарушение внутримолекулярных взаимодействий у белка; общая площадь – это полная энтальпия разупорядочения (общая площадь под термограммой), отражающая термодинамическую стабильность. Согласно наложению всех термограмм (фиг. 6), #1B проявляет наилучшее поведение при DSC. Первый переход, около 70-72°C, должен соответствовать домену СН2. Последний переход, около 82-83°C, должен соответствовать СН3, а самый высокий пик соответствует переходу Fab. У #2A переход Fab находится поверх СН2, у всех других вариантов переход Fab находится поверх перехода СН3, а по крайней мере у #2B плечо на правом конце Fab-перехода должно соответствовать переходу СН3.

6.5. Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC) гуманизованных антител

Гуманизованные антитела #1A, #1B, #2A и #2B анализировали методом SEC-HPLC в буфере PBS. Типичная хроматограмма для #2B представлена на фиг. 7, а результаты приведены в таблице 6. Как видно, все варианты проявляют кажущуюся молекулярную массу, близкую к 160 кДа, что указывает на мономерную конформацию и отсутствие агрегации в исследуемых условиях.

6.6. Последовательности #2B

Исходя из ингибирования, связывания и биофизических свойств, описанных выше, для дальнейшей оптимизации было выбрано антитело #2B. Тяжелая цепь варианта #2B проявляет идентичность на 81,60% (80/98) с гаметным IGHV1-46*01 человека. Легкая цепь #2B проявляет идентичность на 86,3% (82/95) с гаметным IGKV3-15*01. Общий % идентичности #2B составляет 83,94% с эталонными гаметными линиями человека.

Ниже представлены последовательности тяжелых и легких цепей #2B.

Тяжелая цепь

>3352.VH.2B (SEQ ID NO: 11)

```
gcgccgcatgaatttggactgaggctgatttctggtgctgaccctgaaaggcgtccagtgtcaagtccagctcgtccaga
gcgggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtgaaagtctcgtgcaaggcgagcggatatacgttcacgaactactggattcactg
ggtccggcaagcgccggggcagggctggagtggatcggaacatcgaccctcggacacgcggacgcactacaaccagaagtcaa
ggaccggcgacgctgaccctcgacaagagcagcagcggcgtacatggagctgtcagcctcggagcgaggacacggccgtcta
ctactgcgcgagcagcgtgtactacgagggcgtggactactggggcgaggggacgctcgtcagcgtctcagcgttagcacaag
ggcctagtgtttctctggtccctcttccaaatccacttctggtggcactgctgctctgggatgctggtgaaggattcttctgaacct
gtgactgtctcatggaactctggtgctctgacttctggtgtccacactttccctgctgtgctgcagtctagtggtgactgtactctctgtcatctgtg
tactgtgccctctcatctctgggaaccagacctacattgtaatgtgaaccacaaccatccaactaaagtggacaaaagagtggaac
ccaaatcctgtgacaaaaccacacctgccaccttctctgccctgaactgctgggaggaccttctgtgtttctgttcccccaaaccaa
aggataccctgatgatctctagaaccctgaggtgacatgtgtggtggtggatgtgtctcatgaggacctgaggtcaattcaactggtacg
```

tggatggagtggaagtccacaatgccaaaaccaagcctagagaggaacagtacaattcaacctacagagtggcagtgctgactgtgct
 gcatcaggattggctgaatggcaaggaatacaagtgtaaagtctcaaacaaggccctgctgctccaattgagaaaacaatctcaaaggcc
 aagggacagcctagggaaacccaggtctacacctgccacctcaagagaggaaatgacaaaaaccaggtgtccctgacatgcctgg
 caaaggcttctaccttctgacattgctgtggagtgggagtgcaatggacagcctgagaacaactacaaaaacccccctgtgctggatt
 ctgatggctctttcttctgactccaaactgactgtggacaagtctagatggcagcaggggaatgtctttctgctctgcatgcatgaggctct
 gcataaccactacactcagaaatccctgtctctgctcccgggaaatgatagtaaaagctttga

Легкая цепь

>3352.VL.2B (SEQ ID NO: 10)

ggggccgcatgaatttggactgaggctgatttctggtgctgacctgaaaggcgtccagtgtgagatcgtgatgacgcagt
 cggcggcgacgctgagcgtgagtcgggggagcggggcagcgtgagctgcaaggcgtcgaggacgtgagcacggccgtcgctgg
 tatcaacagaagccggggcaagcggcggtgctgatctactgggagcagcggcacacgggcatccggcgcgattctcgggg
 agccggagcgggacggagtagacgctgacgatctcgtcgctgcaaagcaggacttcgcttactactgccagcaggactactcgac
 gccggcagcgttgggggggtaccaaggctgagatcaaactgacggtcggcgcttctgtgttcatttcccccatctgatgaacag
 ctgaaatctggcactgcttctgtggtctgtctgctgaacaactctaccctagagaggccaaagtccagtggaaagtggacaatgctctgag
 agtgggaattccaggaatctgctactgagcaggacttaaggatagcacatactccctgtccttactctgacactgagcaaggctgattac
 gagaaacacaaagtgtacgcctgtgaagtcacacatcaggggctgtctagtctgtgaccaaactcctcaataggggagagtgtgatagta
 aaagctttga

> Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGNIDP
 SDTRTHYNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQTLYYEALDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Легкая цепь (SEQ ID NO: 4)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQDVSTAVAWYQQKPGQAPRLLIYWASTR
 HTGIPARFSGSRSGTEYTLTISSLQSEDFAVYYCQQDYSTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 7. Характеристика гуманизованных вариантов #2B1 и #2B2

Гуманизованное антитело #2B подвергали дальнейшей оптимизации путем введения специфических точечных мутаций в константной области тяжелой цепи mAb, которые устраняют функции как ADCC, так и CDC.

Ниже представлены последовательности полученных антител #2B1 (двойная мутация L234A и L235E) и #2B2 (тройная мутация L234A, L235E и P331S).

2B1 (мутации L234A и L235E)

Тяжелая цепь

SEQ ID NO: 12

gcggccgcatgaatttggactgaggctgatttctggtgctgaccctgaaaggcgtccagtgtcaagtccagctcgtccaga
 gcggggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtgaaagtctctgcaaggcgagcggatatacgttcacgaactactggattcactg
 ggtccggcaagcggcggggcagggctggagtggatcggaacatcgaccctcgacacgcggacgcactacaaccagaagtcaa
 ggaccggcgacgctgaccctcgacaagagcacgagcacggcgtacatggagctgtcgagcctgcggagcgaggacacggccgtcta
 ctactgcgcgcgagacgctgtactacgagggcgtggactactggggcaggggacgctcgtcacggctcgcagcgttagcacaag
 ggccctagtgtttctctggtccctcttccaaatccacttctggtggcactgctgctctgggatgctggtgaaggattcttctgaacct
 gtgactgtctcatggaactctggtgctgacttctggtgtccactttccctgctgtgctgcagtctagtggactgtactctctgtcatctgtgg
 tcaactgtccctctcatctctgggaaccagacctacattgtaatgtgaaccacaaccatccaacactaaagtggacaaaagagtggaac
 ccaaatcctgtgacaaaaccacacctgcccacctgtccggcgcctgaagcgggaaggaggacctctgtgtttctgtccccccaaacca
 aaggataccctgatgatctcggaaccctgaggtgacatgtgtggtggtgatgtgctcatgaggaccccgaagtcaaatttaattggtat
 gtcgacggcgtcgaggtgcataatgccccaaaccaagcctagagaggaacagtacaattcaacctacagatcgtcagtgctgactgtgc
 tgcacaggattggctgaatggcaaggaatacaagtgtaaagtctcaacaaggccctgctccaattgagaaaacaatctcaaaggc
 caagggacagcctagggaaaccaggtctacaccctgccacctcaagagaggaaatgaccaaaaaccaggtgtccctgacatgctgg
 tcaaaggcttctaccctctgacattgtgtggagtgggagtcaaatggacagcctgagaacaactacaaaacaacccccctgtgctggatt
 ctgatggctctttctgtactccaaactgactgtggacaagtctagatggcagcaggggaatgtctttctgctctgtcatgcatgaggtct
 gcataaccactacactcagaaatccctgtctctgtctcccgggaaatgataagcttga

Легкая цепь

Такая же, как у 2B (см. SEQ ID NO: 10)

> Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGNIDP
 SDTRTHYNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQTLYYEALDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KRVEPKSCDK

THTCPPCPAPEAEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG

KEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

> Легкая цепь

Такая же, как у 2B (см. SEQ ID NO: 4)

2B2 (мутации L234A, L235E и P331S)

Тяжелая цепь

SEQ ID NO: 13

gcgccgcatgaatgactgaggctgatttctggtgctgaccctgaaaggcgtccagtgtcaagtccagctcgtccaga
 gcggggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtgaaagtctctgcaaggcgagcggatatacgttcacgaactactggattactg
 ggtccggcaagcggcgggcgaggctggagtggatcgggaacatcgaccctcggacacgcggacgcactacaaccagaagtcaa
 ggaccggcgacgctgaccctcgacaagagcagcagcggcgtacatggagctgtcagcctcggagcaggacacggcctcta
 ctactgcgcgagcagcgtgtactacgaggcgtggactactggggcgaggacgctcgtcacggtctcagcgttagcacaag
 ggccctagtgtttctctggtccctcttccaaatccactctggtggcactgctgctctgggatgcctggtgaaggattcttctgaacct
 gtgactgtctcatggaactctggtgctctgactctggtgccactttccctgctgtgctgagctctagtgactgtactctctgtcatctgtg
 tctactgtccctctcatctctgggaaccagacctacatttgaatgtgaaccacaaccatccaactaaagtggacaaaagagtggaac
 ccaaatctgtgacaaaaccacacctgccacctgtccggcgcctgaagcgggaaggaggacctctgtgtttctgtccccccaacca
 aaggataccctgatgatctcgcgaaccctgaggtgacatgtgtggtggtggatgtgtctcatgaggaccccgaaagtaatttaattggtat
 gtcgacggcgtcaggtgcataatgccaaaaccaagcctagagaggaacagtacaattcaacctacagatcgtcagtgctgactgtgc
 tgcacaggttggtgaaatggcaaggaatacaagtgtaaagtctcaacaaggcctgcttcaattgagaaaacaatctcaaaggcc
 aaggacagcctagggaaaccaggtctacacctgccacctcaagagaggaaatgacaaaaaccaggtgtccctgacatgcctggt
 caaagcttctaccttctgacattgctgtggagtgggagtcaaatggacagcctgagaacaactacaaaacaacccccctgtgctggatt
 ctgatggctctttcttctgactcctaactgactgtggacaagtctagatggcagcaggggaatgtctttctgctctgtcatgcatgaggctct
 gcataaccactacactcagaaatccctgtctctgctctccgggaaatgataagcttgatgtcatgcatgaggctctgcataaccactacactc
 agaaatccctgtctctgctctccgggaaatgataagcttga

Легкая цепь

Такая же, как у 2B (см. SEQ ID NO: 10)

> Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNFWIHWVRQAPGQGLEWIGNIDP
 SDTRTHYNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQTLYYEALDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KRVEPKSCDK

THTCPPCPAPEAEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG

KEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

> Легкая цепь

Такая же, как у 2B (см. SEQ ID NO: 4)

7.2. Определение сродства гуманизованных антител #2B1 и #2B2 по SPR

Определяли константы сродства (K_D) при связывании pro-sPLA2-GIB и sPLA2-GIB с антителами #2B1 и #2B2 по поверхностной кинетике методом поверхностного плазмонного резонанса с биосенсором в реальном времени (BIAcore™). Антитела фиксировали на поверхности с антителом против IgG мыши и подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантного белка pro-sPLA2-GIB или sPLA2-GIB. Проводили кинетический анализ с помощью программного обеспечения BIAevaluation™, получая константы скорости ассоциации и диссоциации (таблица 7). Как видно из таблицы 7, введение двойных или тройных мутаций в #2B1 или #2B2 существенно не повлияло на сродство вариантов к их мишени sPLA2-GIB.

7.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия гуманизованных антител #2B1 и #2B2

Нормализованная термическая денатурация антител #2B1 и #2B2 представлена на фиг. 8, а параметры DSC – в таблице 8. #2B1 проявляет лучший профиль в этих экспериментах, так как значения T_{onset} и T_{m1} (что соответствует CH2) были выше.

7.4. Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC) гуманизованных антител #2B1 и #2B2

Антитела #2B1 и #2B2 анализировали методом SEC-HPLC в буфере PBS. Результаты приведены в таблице 9. Как видно, менее 5% mAb находится в высокомолекулярных агрегатах, что указывает на мономерную конформацию и отсутствие агрегации в исследуемых условиях.

7.5. Капиллярный изоэлектрический фокусирующий Анализ гуманизованных антител #2B1 и #2B2 методом капиллярного изоэлектрического фокусирования

Определяли изоэлектрические точки и относительное распределение вариантов с различным зарядом антител #2B, #2B1 и #2B2 методом визуализированного капиллярного изоэлектрического фокусирования (icIEF). Результаты приведены в таблице 10. Для всех антител были получены воспроизводимые результаты с низкими значениями % RSD. Значение pI главного пика составляло 8,96 для #2B, 8,76 для #2B1 и 8,75 для #2B2. Помимо слегка другого pI главного пика, #2B также проявляет немного другой профиль варианта по заряду, в отличие от двух других образцов. В то время, как #2B1 и #2B2 имеют более щелочной заряд, чем кислотный, для #2B верно обратное (таблица 10). Главный пик у #2B составлял 64% от всех пиков, тогда как у #2B1 и #2B2 главный пик составлял только 57%. Во всех исследованных образцах не было обнаружено предкислотных и постщелочных пиков.

7.6. Связывание антител #2B, #2B1 и #2B2 с FcγR человека

Связывание мономерных антител #2B, #2B1 и #2B2 с FcγR человека тестировали методом проточной цитометрии при инкубации этих mAb с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FcγRI, FcγRIIA(H131), FcγRIIA(R131), FcγRIIB, FcγRIIA(F176), FcγRIIA(V176), FcγRIIB(NA1), FcγRIIB(NA2) и FcγRIIB(SH) человека (REF P. Bruhns). Как видно из фиг. 9, #2B связывается только с hFcγRI и hFcγRIIA(V176), тогда как не наблюдалось связывания мономерных #2B1 и #2B2 со всеми исследованными hFcγR. Иммуные комплексы антитело-антиген тестировали, сначала инкубируя mAb с антигеном, а затем инкубируя образовавшиеся иммунные комплексы с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FcγR человека. Иммунный комплекс #2B связывается со всеми исследованными hFcγR, кроме hFcγRIIB (фиг. 10). Наблюдается слабое связывание для иммунного комплекса #2B1 с hFcγRIIA(V176) (данные не приводятся), тогда как иммунный комплекс #2B2 не связывается ни с какими исследованными hFcγR (данные не приводятся). Остаточное связывание антигена на сенсibilизированных антителами клетках тестировали, сначала инкубируя антитела #2B, #2B1 и #2B2 с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FcγR человека. После отмывки добавляли биотинилированный антиген sPLA2-IB и проводили детектирование методом проточной цитометрии с помощью конъюгата авидин-FITC. Как видно из фиг. 11, наблюдалось остаточное связывание антигена sPLA2-GIB с mAb #2B, связывавшимся с hFcγRI и hFcγRIIA(V176). Напротив, не наблюдалось остаточного связывания антигена sPLA2-GIB с mAb #2B1 и #2B2.

7.7. Совместная кристаллизация Fab #2B2 с sPLA2-GIB и определение эпитопа

Fab-фрагмент #2B2 подвергали кристаллизации вместе с его антигеном, sPLA2-GIB, и собирали данные по дифракции рентгеновских лучей у данных кристаллов на PROXIMA-1 Beamline в синхротроне Soleil (St. Aubin, Франция). Кристаллы относятся к пространственной группе P21 ($a = 71.9\text{Å}$, $b = 83.8\text{Å}$, $c = 103.9\text{Å}$; $\alpha = \beta = 99,58^\circ$) с двумя комплексами sPLA2-GIB/Fab на 1 асимметричное звено (фиг. 12A). Разрешение структуры комплекса sPLA2-GIB/Fab позволило идентифицировать критические остатки, задействованные в нековалентных взаимодействиях в этом комплексе, и определить эпитоп #2B2. Как видно из фиг. 12B, во взаимодействии с легкой цепью Fab участвуют W3, R6 и K7 у sPLA2-GIB, а во взаимодействии с тяжелой цепью Fab участвуют K10, C77, Y75, G79 и S80 у sPLA2-GIB.

Пример 8. Биологические свойства гуманизованного антитела #2B2

8.1. Действие гуманизованного антитела #2B *in vitro* на ингибирование sPLA2-GIB или плазмой ВИЧ-инфицированных пациентов ядерной транслокации фосфо-STAT5

Способность антитела #14G9 или #2B противодействовать ингибирующему действию 75 нМ sPLA2-GIB или плазмы, выделенной от ВИЧ-1-инфицированных пациентов, на индуцированную IL-7 ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 тестировали путем инкубации плазмы, выделенной от ВИЧ-1-инфицированных пациентов, с mAb #14G9 или #2B.

Как видно из фиг. 13, возрастающие количества mAb #14G9 или #2B приводили к дозозависимому восстановлению способности sPLA2-GIB (фиг. 13A) или плазмы от вирусных пациентов (фиг. 13B) ингибировать ядерную транслокацию фосфоSTAT5, индуцированную IL-7 в Т-клетках CD4 человека, выделенных от одного здорового донора. EC₅₀ для восстановления действия sPLA2-GIB составляла 3,7 нг/мл и 2,2 нг/мл для mAb #2B и #14G9, соответственно. EC₅₀ для восстановления действия ВИЧ-инфицированной плазмы составлял 3,3 нг/мл и 2,7 нг/мл для mAb #2B и #14G9, соответственно.

8.2. Действие антитела #2B2 *in vivo* на ингибирование sPLA2-GIB ядерной транслокации фосфо-STAT5

Способность mAb #2B2 противодействовать *in vivo* ингибирующему действию введения sPLA2-GIB на индуцированную IL-7 ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4 тестировали путем введения мышам сначала 1 или 2 мг mAb #2B2, а затем введения 100 мкг sPLA2-GIB. После этого анализировали ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4, выделенных из спленоцитов обработанных мышей, методом конфокальной микроскопии.

Как видно из фиг. 14, введение мышам 100 мкг sPLA2-GIB приводило к 50%-му ингибированию ядерной транслокации фосфо-STAT5 в Т-клетках CD4, выделенных из спленоцитов. Этот эффект полностью устранялся при предварительном введении 1 или 2 мг mAb #2B2, причем при контрольных инъекциях не наблюдалось значительного эффекта.

Таблица 1

| Гаметная линия IMGT человека | Вариабельные участки | | | Количество идентичных остатков |
|---------------------------------|----------------------|----------------|-----------|-----------------------------------|
| | Гибридома | Гуманизованный | | |
| | | вариант А | вариант В | |
| степень идентичности (%) | | | | |
| IGHV1-46*01 | 66,3 | 80,6 | 81,6 | 65 - 79-80 / 98 |
| IGHV5-10-1*04 | 58,2 | 80,6 | 81,6 | 57 - 79-80 / 98 |
| IGKV1-39*01 | 67,4 | 83,2 | 84,2 | 64 - 79-80 / 95 |
| IGKV3-15*01 | 62,1 | 85,3 | 86,3 | 59 - 81-82 / 95 |

Таблица 2

| Номенклатура по Kabat | FWR1 | CDR1 | FWR2 | CDR2 | FWR3 | CDR3 | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|--|
| Гуманизованные варианты | | | | | | | Итого | |

| | | | | | | | | |
|------------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|------------------|
| Количество остатков V _H | 30 | 5 | 14 | 17 | 32 | 0 | 98 | Идентичность (%) |
| IGHV1-46*01 вариант А | 0 | 3 | 2 | 9 | 5 | NR | 19 | 80,6% (79/98) |
| IGHV1-46*01 вариант В | 0 | 3 | 1 | 9 | 5 | NR | 18 | 81,6% (80/98) |
| IGHV5-10-1*04 вариант А | 2 | 2 | 2 | 9 | 4 | NR | 19 | 80,6% (79/98) |
| IGHV5-10-1*04 вариант В | 2 | 2 | 1 | 9 | 4 | NR | 18 | 81,6% (80/98) |
| Количество остатков V _L | 23 | 16 | 15 | 7 | 32 | 7 | 100 | Идентичность (%) |
| IGKV1-39*01 вариант А | 0 | 7 | 1 | 5 | 2 | 1 | 16 | 83,2% (79/95) |
| IGKV1-39*01 вариант В | 0 | 7 | 0 | 5 | 2 | 1 | 15 | 84,2% (80/95) |
| IGKV3-15*01 вариант А | 0 | 5 | 1 | 2 | 2 | 4 | 14 | 85,3% (81/95) |
| IGKV3-15*01 вариант В | 0 | 5 | 0 | 2 | 2 | 4 | 13 | 86,3% (82/95) |

Таблица 3

| mAb (мкг) | Ингибирование ферментативной активности (% от контроля) | | | |
|-----------|---|--------|--------|--------|
| | Ab #1A | Ab #1B | Ab #2A | Ab #2B |
| 0,1 | 64% | 60% | 55% | 42% |
| 0,3 | 41% | 42% | 33% | 24% |
| 1 | 19% | 22% | 20% | 13% |
| 3 | 14% | 12% | 12% | 10% |

Таблица 4

| Гуманизованное Ab | pro-sPLA2-GIB IC ₅₀ (нМ) | sPLA2-GIB IC ₅₀ (нМ) |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| #1A | 1053 | 1,9 |
| #1B | 263 | 3,3 |
| #2A | 216 | 1,9 |
| #2B | 341 | 2,3 |

Таблица 5

| Название образца | Конц. (мМ) | T _{1/2} (°C) | ΔH (кал/М) | T _{onset} (°C) | T _{m1} (°C) | T _{m2} (°C) | T _{m3} (°C) |
|------------------|------------|-----------------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Ab #1A | 0,0034 | 5,01 | 1,04E6 | 65,26 | 70,65 | 78,84 | - |
| Ab #1B | 0,0137 | 5,01 | 1,09E6 | 64,28 | 71,19 | 81,94 | - |
| Ab #2A | 0,0078 | 5,00 | 1,06E6 | 64,76 | 74,15 | - | 82,70 |
| Ab #2B | 0,0074 | 5,02 | 1,03E6 | 64,68 | 70,59 | 77,81 | 83,85 |

Таблица 6

| | Время удержания | Площадь (%) | Расчетная м.м. (кДа) |
|--------|-----------------|-------------|----------------------|
| Ab #1A | 6,186 | 97,55 | 158 |
| Ab #1B | 6,193 | 97,19 | 157 |
| Ab #2A | 6,181 | 93,96 | 159 |
| Ab #2B | 6,183 | 97,52 | 159 |

Таблица 7

| mAb | Антиген | k _{on} (10 ⁴ М ⁻¹ ·с ⁻¹) | k _{off} (10 ⁻⁴ с ⁻¹) | T _{1/2} (мин) | K _D (пМ) |
|------|---------------|---|--|------------------------|---------------------|
| #2B | sPLA2-GIB | 289 ± 12 | 22,5 ± 2,0 | 5,1 ± 0,4 | 786 ± 63 |
| #2B1 | sPLA2-GIB | 278 ± 1 | 20,3 ± 0,4 | 5,7 ± 0,1 | 729 ± 9 |
| #2B2 | sPLA2-GIB | 302 ± 2 | 24,7 ± 1,3 | 4,7 ± 0,2 | 796 ± 8 |
| #2B | pro-sPLA2-GIB | 17,6 ± 0,4 | 1417 ± 25 | 0,080 ± 0,002 | 784900 ± 31600 |
| #2B1 | pro-sPLA2-GIB | 18,1 ± 0,4 | 1551 ± 51 | 0,074 ± 0,003 | 853400 ± 12400 |
| #2B2 | pro-sPLA2-GIB | 16,4 ± 1,2 | 1462 ± 129 | 0,079 ± 0,007 | 879500 ± 28300 |

Таблица 8

| Название образца | Конц. (мМ) | T _{1/2} (°C) | ΔH (кал/М) | T _{onset} (°C) | T _{m1} (°C) | T _{m2} (°C) | T _{m3} (°C) |
|------------------|---------------|--------------------------|---------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Ab #2B1 | 0,0060 | 5,02 | 0,591E6 | 64,16 | 68,66 | 77,60 | 83,38 |
| Ab #2B2 | 0,0074 | 5,01 | 0,785E6 | 56,97 | 64,53 | 78,00 | 84,10 |

Таблица 9

| | Время удержания | Площадь (%) | Расчетная м.м. (кДа) |
|---------|-----------------|-------------|----------------------|
| Ab #2B1 | 6,128 | 96,30 | 170,53 |
| Ab #2B2 | 6,159 | 97,18 | 166,12 |

Таблица 10

| Название образца | Кислый 3 | Кислый 2 | Кислый 1 | Главный пик | Щелочной 1 | Щелочной 2 | Щелочной 3 |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Ab #2B | 8,76 | 8,84 | 8,89 | 8,96 | 9,06 | 9,13 | н/п |
| Ab #2B1 | 8,36 | 8,50 | 8,64 | 8,76 | 8,88 | 8,99 | 9,05 |
| Ab #2B2 | 8,35 | 8,49 | 8,63 | 8,75 | 8,87 | 8,98 | 9,04 |

Библиография

Eskola, J.U., Nevalainen, T.J. & Aho, H.J., 1983a. Purification and Characterization of Human Pancreatic Phospholipase A2., 29(10), pp. 1772-1776.

Eskola, J.U., Nevalainen, T.J. & Aho, H.J., 1983b. Purification and Characterization of Human Pancreatic Phospholipase A2., 29(10), pp. 1772-1776.

Kitagawa, M. et al., 1991. The diagnostic value of serum pancreatic phospholipase A2 (PLA2) in pancreatic diseases. *Gastroenterologia Japonica*, 26(1), pp. 62-68.

Kolko, M. et al., 2007. Human secretory phospholipase A2, group IB in normal eyes and in eye diseases. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 85(3), pp. 317-323.

Lambeau, G. & Gelb, M.H., 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry*, 77, pp. 495-520. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405237>.

Nakano, T. et al., 1994. Plasmin converts pro-form of group I phospholipase A2 into receptor binding, active forms. *Biochemical and biophysical research communications*, 198(1), pp. 10-15.

Nevalainen, T.J. et al., 1985. Immunoreactive phospholipase A2 in serum in acute pancreatitis and pancreatic cancer. *Clin Chem*, 31(7), pp. 1116-1120. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2408788>.

Nevalainen, T.J. & Haapanen, T.J., 1993. Distribution of pancreatic (group I) and synovial-type (group II) phospholipases A2 in human tissues. *Inflammation*, 17(4), pp. 453-464.

Nishijima, J. et al., 1983. Purification and characterization of human pancreatic phospholipase A2 and development of a radioimmunoassay. *Journal of biochemistry*, 94(1), pp. 137-147.

Ramanadham, S. et al., 1998. Type IB secretory phospholipase A2 is contained in insulin secretory granules of pancreatic islet cells and is co-secreted with insulin from glucose-stimulated islets. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1390(3), pp. 301-312.

Rouault, M. et al., 2007. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry*, 46(6), pp. 1647-1662.

Singer, A.G. et al., 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), pp. 48535-48549.

Sternby, B., 1984. Immunoreactive pancreatic colipase, lipase and phospholipase A2 in human plasma and urine from healthy individuals., 789, pp. 164-169.

Theze Jacques, Thierry R. & Bugault Florence, 2015. Patent application WO 2015/097140A1.pdf.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое или гуманизованное антитело или его производное, которое связывается с sPLA2-GIB человека.
2. Антитело по п. 1 или его производное, которое является моноклональным.
3. Антитело или производное по п. 1 или 2, которое связывается с эпитопом, включающим по меньшей мере один аминокислотный остаток из числа W3, R6, K7, K10, C77, Y75, G79 и S80 sPLA2-GIB человека согласно SEQ ID NO: 14.
4. Антитело или производное по п. 1 или 2, которое конкурентно ингибирует связывание моноклонального антитела #2B с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело #2B содержит вариабельную область легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 2, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 3.
5. Антитело или производное по п. 1 или 2, которое конкурентно ингибирует связывание моноклонального антитела #2B с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело #2B содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 5.
6. Антитело или производное по п. 1, которое конкурентно ингибирует связывание моноклонального антитела #2B1 с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело #2B содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 6.
7. Антитело или производное по п. 1, которое конкурентно ингибирует связывание моноклонального антитела #2B1 с sPLA2-GIB человека, причем данное моноклональное антитело #2B содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7.
8. Антитело или производное по любому из предыдущих пунктов, которое нейтрализует sPLA2-GIB.
9. Выделенное антитело по п. 1, которое содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 5.
10. Выделенное антитело по п. 1, которое содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 6.
11. Выделенное антитело по п. 1, которое содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7.

12. Выделенное антитело по п. 1, которое содержит
CDR-L1: аминокислотные остатки QDVSTA,
CDR-L2: аминокислотные остатки WAS,
CDR-L3: аминокислотные остатки QQDYSTPPT,
CDR-H1: аминокислотные остатки GYTFTNYW,
CDR-H2: аминокислотные остатки IDPSDTRT, и
CDR-H3: аминокислотные остатки ARQTLYYEALDY.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или производное по любому из предыдущих пунктов, или же легкую или тяжелую цепь такого антитела, либо его переменный домен.

14. Нуклеиновая кислота по п. 13, включающая последовательность нуклеотидов, выбранную из числа SEQ ID NOs: 10-13, либо комплементарную ей.

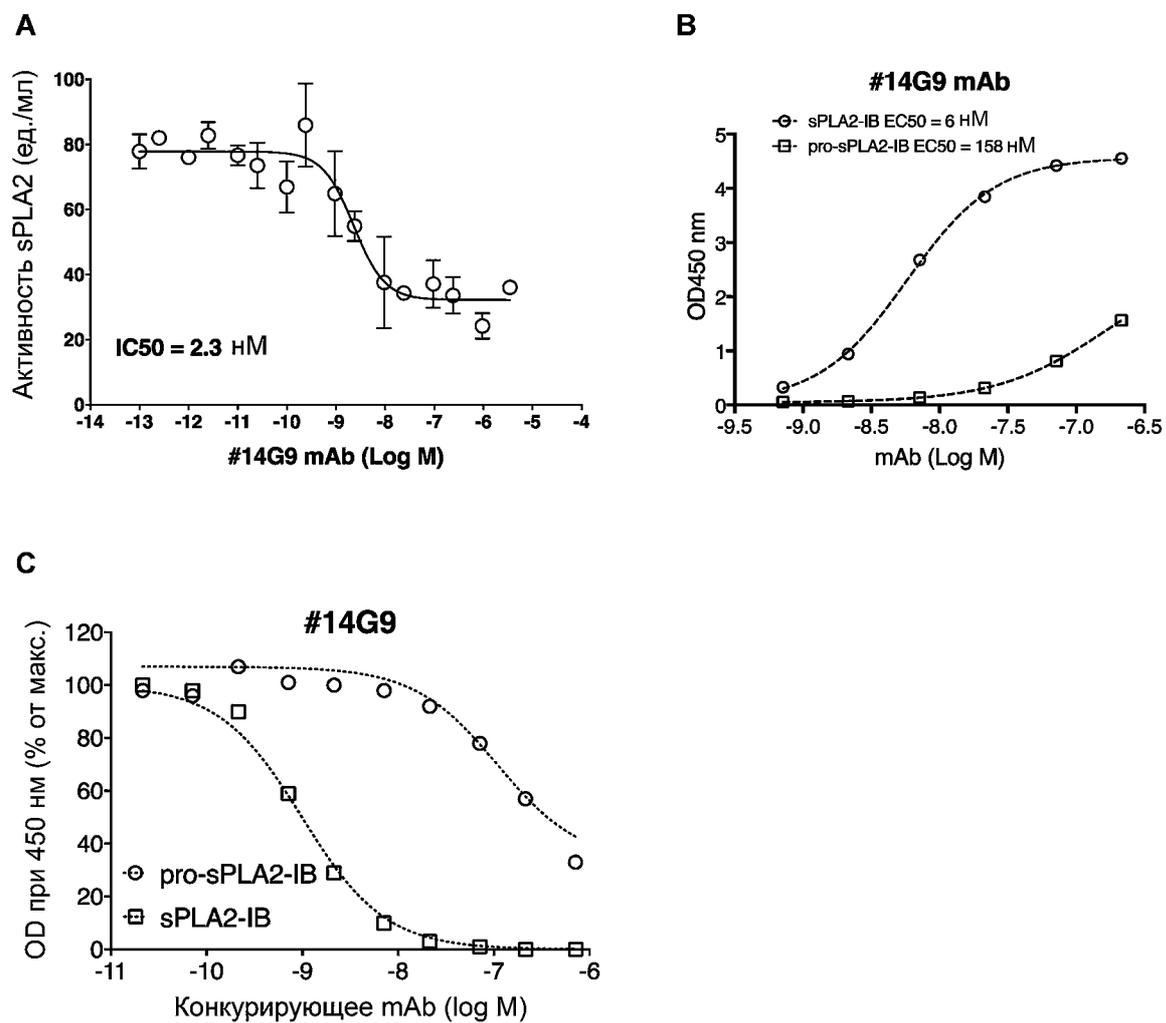
15. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 13 или 14.

16. Рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие вектор по п. 15 или нуклеиновую кислоту по п. 13.

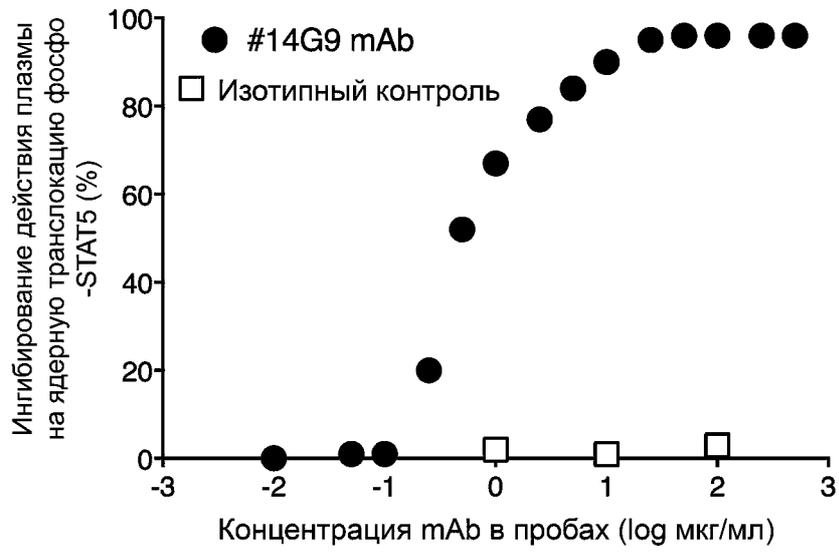
17. Фармацевтическая композиция, содержащая: (i) антитело или производное по любому из пп. 1-12 либо вектор по п. 15 либо нуклеиновую кислоту по п. 13 либо рекомбинантную клетку-хозяина по п. 16 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

18. Антитело или производное по любому из пп. 1-12 для применения при лечении заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

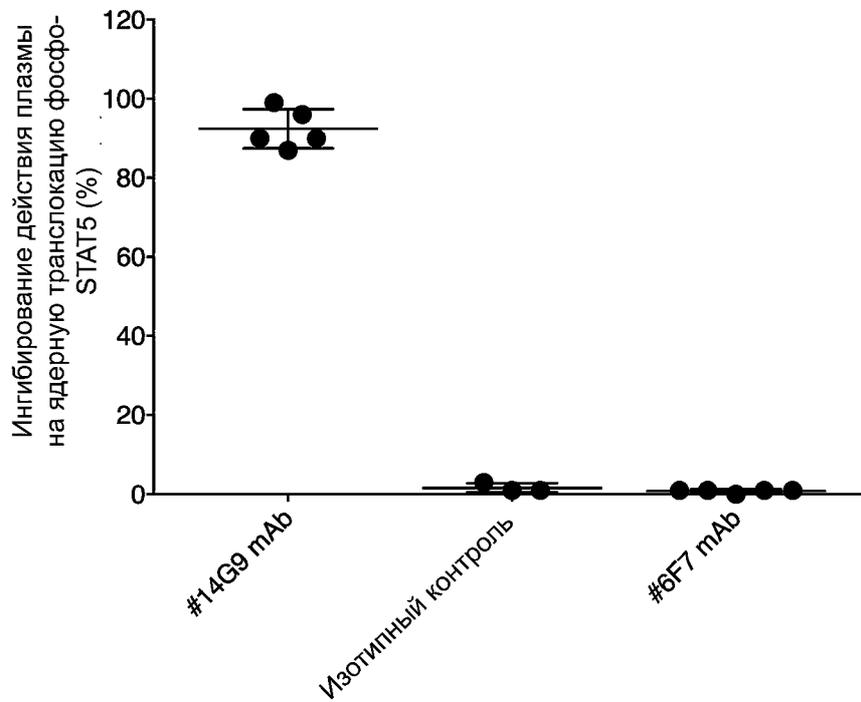
19. Способ получения антитела по любому из пп. 1-12, включающий культивирование клеток по п. 16 в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно извлечение данного антитела.



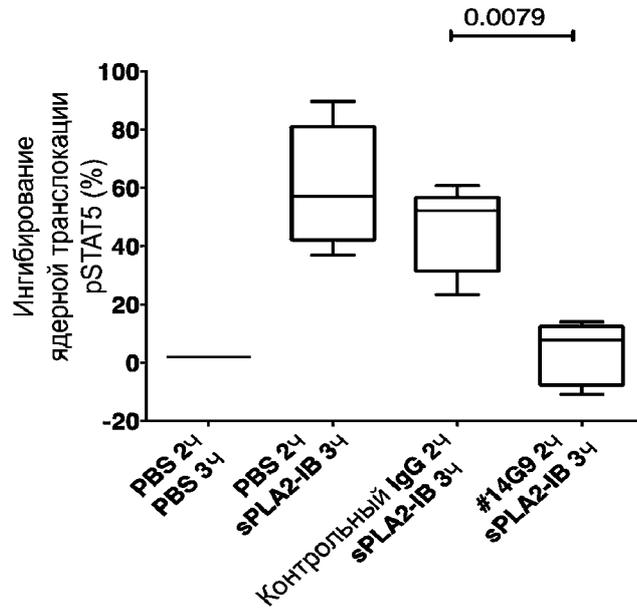
Фиг. 1



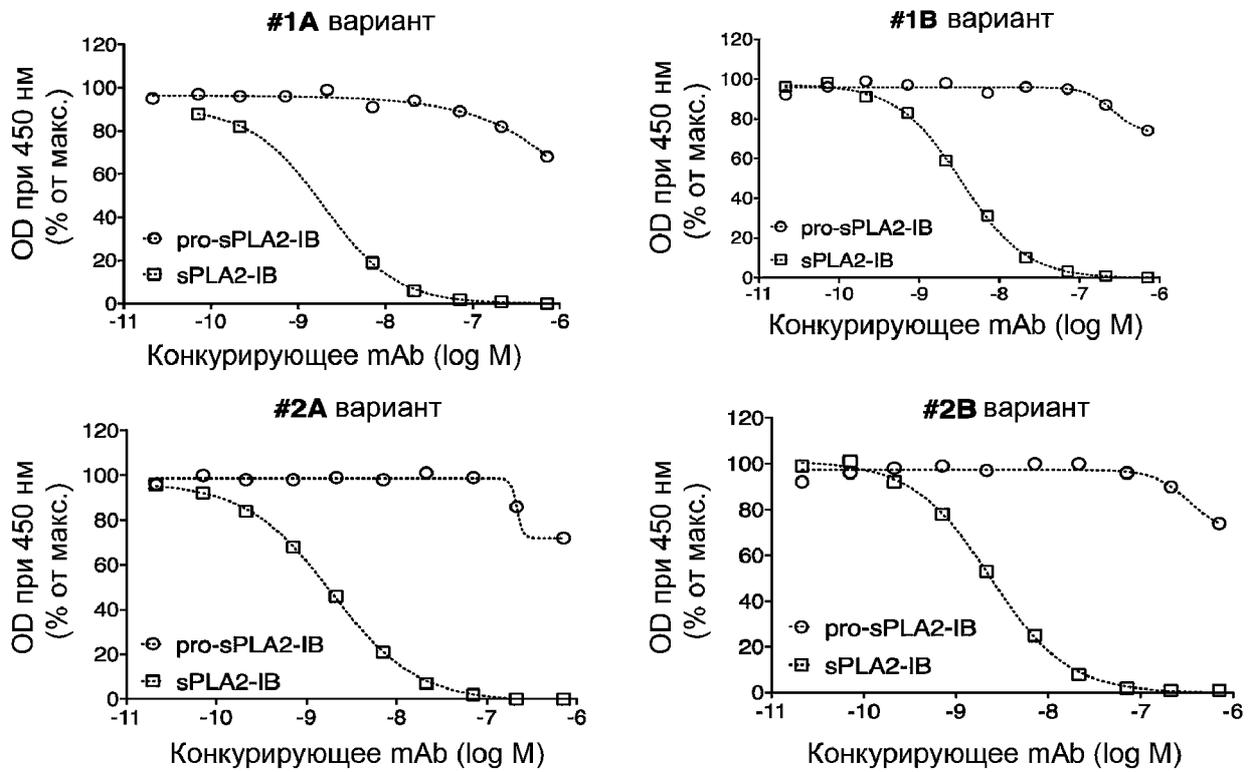
Фиг. 2



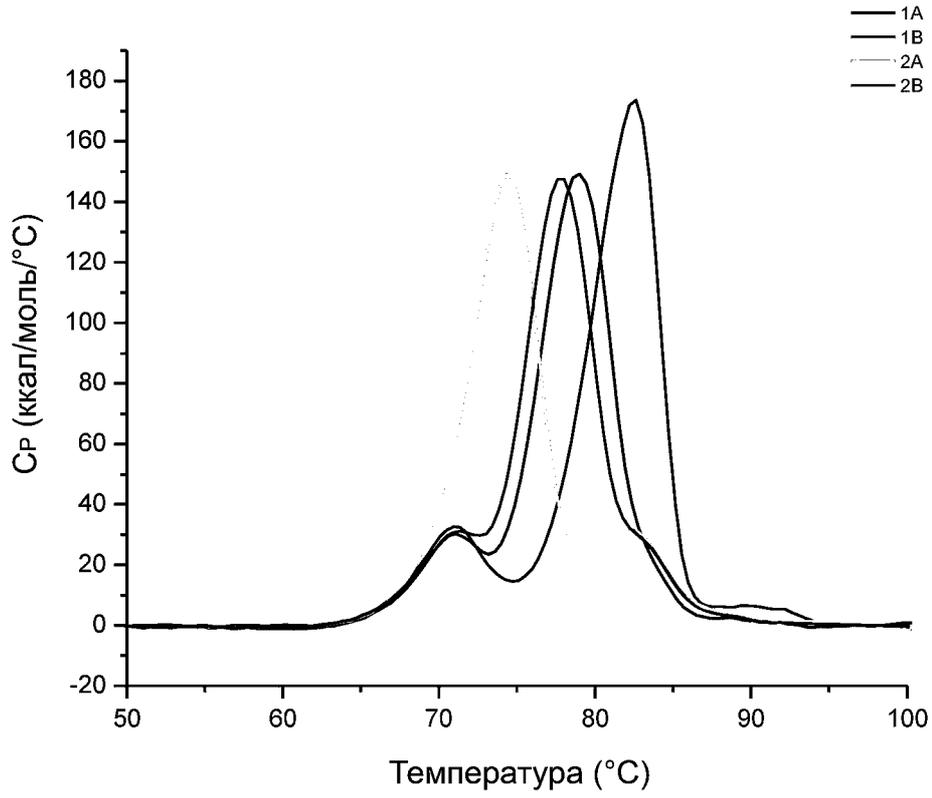
Фиг. 3



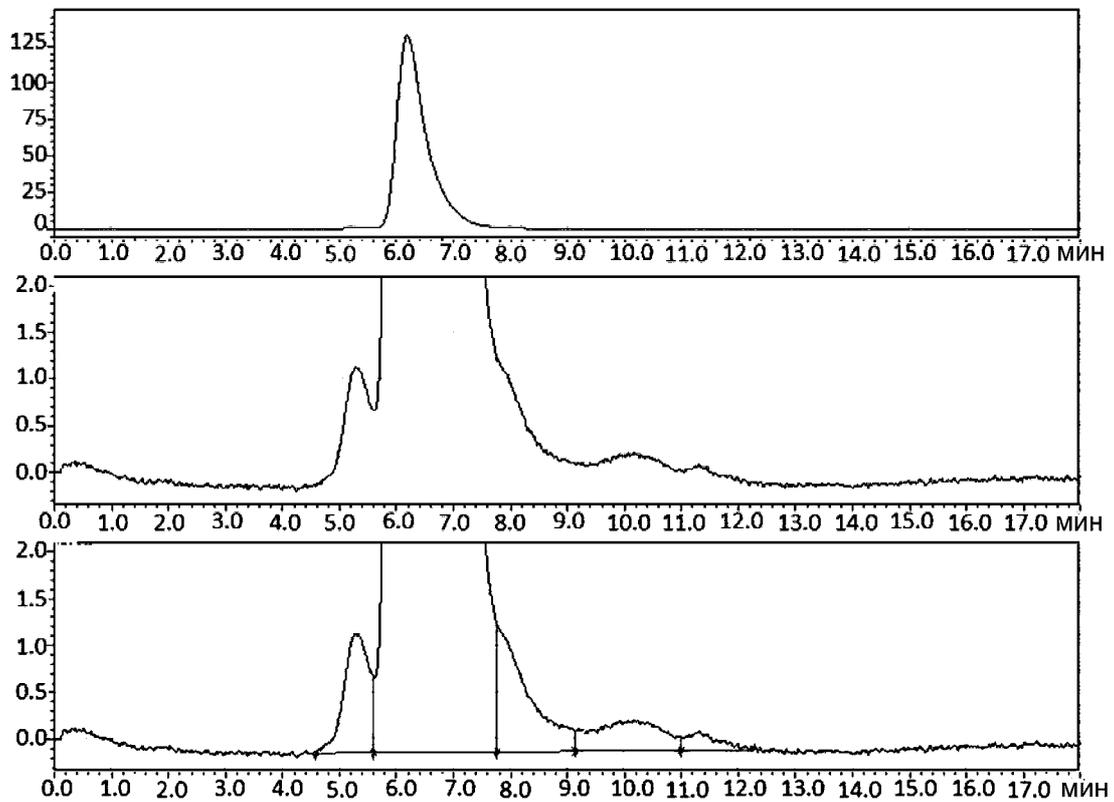
Фиг. 4



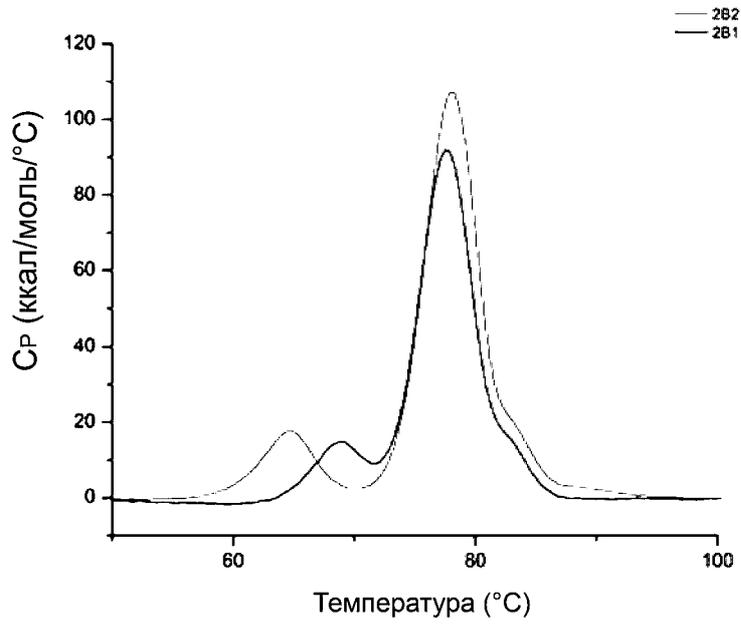
Фиг. 5



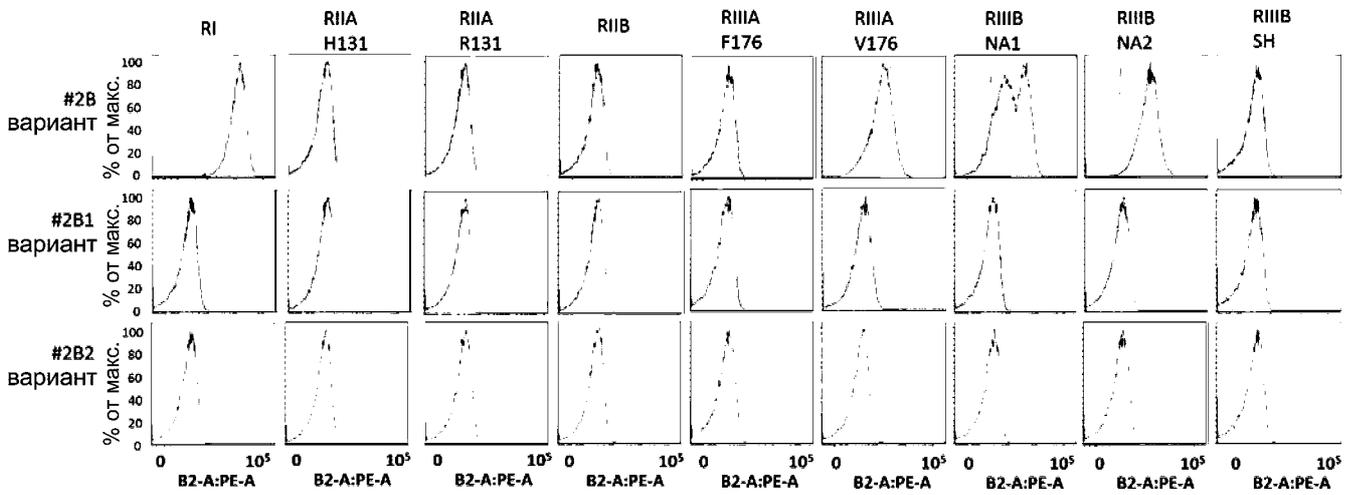
ФИГ. 6



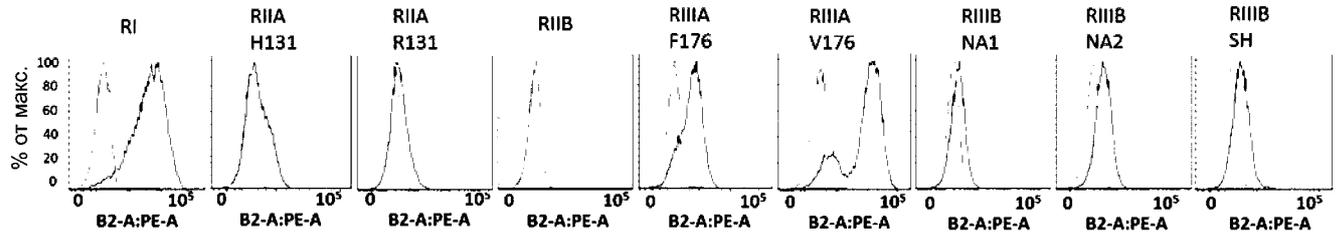
ФИГ. 7



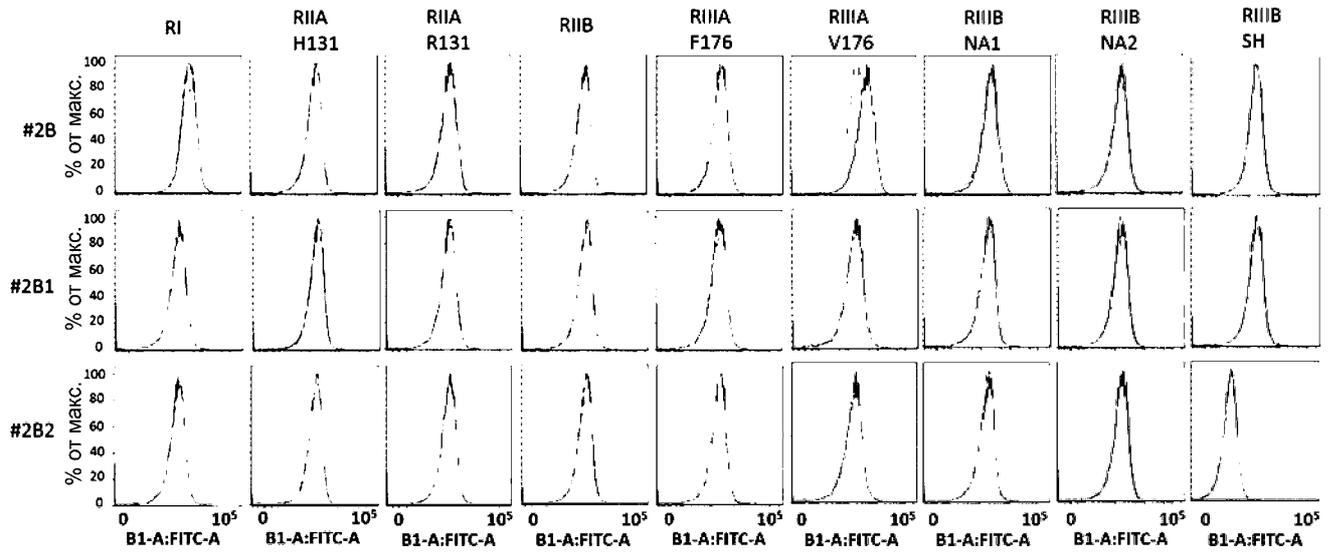
Фиг. 8



Фиг. 9

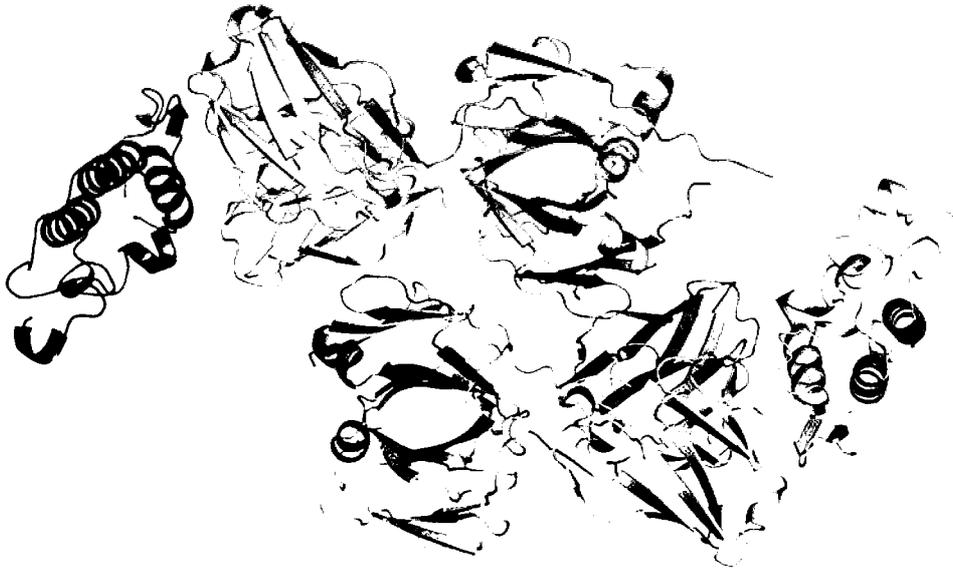


ФИГ. 10

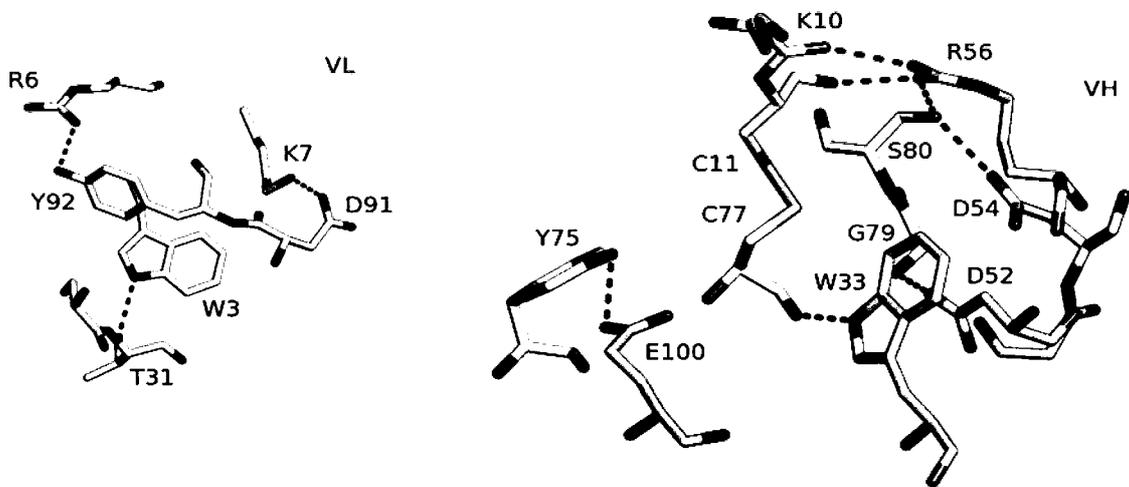


ФИГ. 11

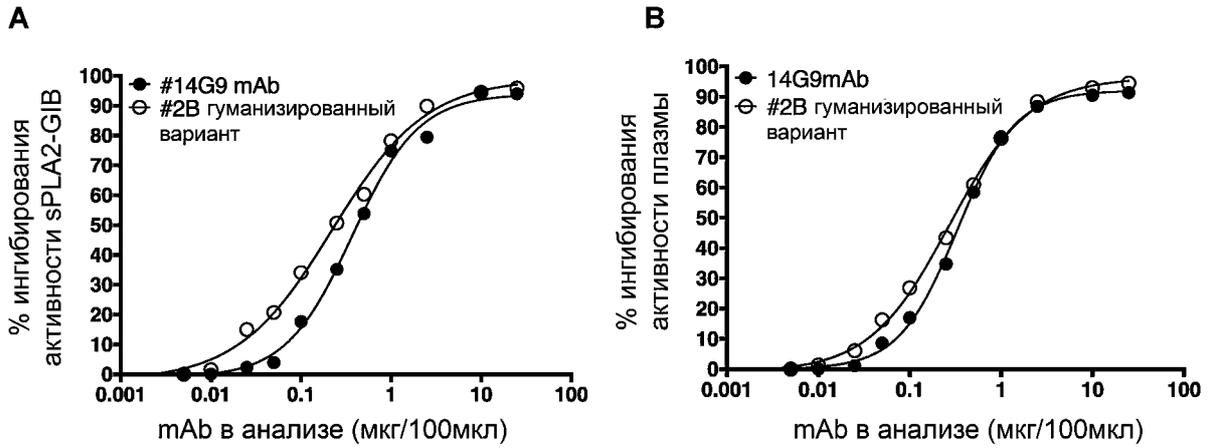
A



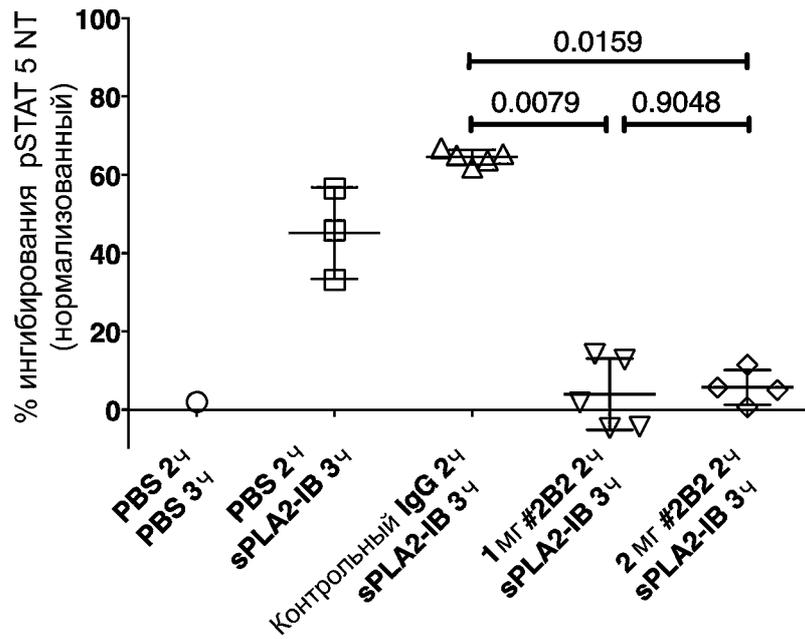
B



ФИГ. 12



Фиг. 13



Фиг. 14