

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190674 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.10

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

(22) Дата подачи заявки
2019.11.20

(54) АНТИТЕЛА К СТАФИЛОКОККУ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/770,608; 62/822,029; 62/865,436
(32) 2018.11.21; 2019.03.21; 2019.06.24
(33) US
(86) PCT/US2019/062370
(87) WO 2020/106814 2020.05.28
(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Зумстег Анна, Киратсоус Кристос,
Прасад Бринда, Коппи Алида (US)
(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)

(57) Представлены оптимизированные в соответствии с видом антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с антигенами стафилококка, при этом антитела и антигенсвязывающие фрагменты характеризуются ослабленным связыванием Fc с белком А или гомологичным белком. Также представлены композиции, содержащие антитела, и способы их применения. Антитела и композиции являются применимыми для лечения стафилококковой инфекции, снижения бактериальных титров в сыворотке крови или почках и лечения симптомов, связанных со стафилококковой инфекцией. Антитела могут также предупреждать тяжесть и/или продолжительность первичного заболевания.

202190674
A1

202190674

A1

АНТИТЕЛА К СТАФИЛОКОККУ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам человеческих антител, которые специфически связываются с антигенами *S. aureus*, но проявляют ослабленное связывание Fc с белком A, композициям, содержащим данные антитела, и терапевтическим способам применения данных антител.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием «10495WO01_SEQ_LIST_ST25.txt», дата создания 20 ноября 2019 года, и размером приблизительно 96 Кб. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] *Staphylococcus aureus* представляет собой бактерию, принадлежащую к аэробным грамположительным коккам, которая обычно колонизирует полость носа и кожу здоровых людей. Бактерии *Staphylococcus aureus*, иногда также называемые «*Staph*», «*Staph. aureus*» или «*S. aureus*», считаются оппортунистическими патогенами, которые обуславливают менее серьезные инфекционные заболевания, такие как угревая сыпь, фурункулы и другие инфекционные заболевания мягкой ткани. Однако *S. aureus* представляет собой существенную причину заболеваемости и смертности как людей, так и животных, а системная инфекция может вызывать эндокардит, артрит, остеомиелит, пневмонию, септический шок и даже смерть. Внутрибольничная инфекция, вызванная *S. aureus*, возникает часто и является наиболее частой причиной развития внутрибольничных инфекций послеоперационных ран и пневмонии. Инфекция, вызванная *S. aureus*, является также

второй наиболее частой причиной развития инфекционных заболеваний сердечно-сосудистой системы и системы кровотока. Введение антибиотика является стандартным способом лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, но в зависимости от типа инфекции (например, кожные инфекции являются пропорционально устойчивыми к антибиотикам) и страны, устойчивые к антибиотикам инфекции могут быть более распространены. Например, у метициллинрезистентного *S. aureus* (MRSA) развилась устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, таким как пенициллин и цефалоспорины, и регулярно наблюдается *S. Aureus*, обладающий устойчивостью к ванкомицину и линезолиду. Необходимы новые подходы к предотвращению и лечению инфекций, вызванных *S. aureus*.

[0004] Неповрежденная кожа и слизистые оболочки являются естественным барьером и защищают от инфекций, вызванных *S. aureus*. Повреждения, такие как ожоги, травмы и хирургические вмешательства повышают риск развития инфекционного заболевания, как и заболевания, которые ставят под угрозу иммунную систему, включающие сахарный диабет, заболевание почек в терминальной стадии и рак. Оппортунистические инфекции, вызванные *S. aureus*, могут приобретать серьезный характер, вызывая множество заболеваний или состояний, неограничивающие примеры которых включают целлюлит, бактериемию, некроз кожи, инфекцию века, инфекцию глаз, неонатальный конъюнктивит, остеомиелит, импетиго, фурункулы, синдром ошпаренной кожи, отравление пищевыми продуктами, пневмонию, послеоперационную инфекцию, ожоговую инфекцию, менингит, эндокардит, сепсис, синдром токсического шока или септический артрит.

[0005] *S. aureus* экспрессирует ряд поверхностных антигенных детерминант, включая контролируемые железом поверхностные детерминанты белков IsdA, IsdB, IsdC, IsdE и IsdH, белка A (SpA) *S. aureus* и полисахарида поли-N-ацетилглюкозамина (PNAG), белков фактора слипания ClfA и ClfB, капсульного полисахарида типа (CP) 5 и CP8, белков с серин-аспаратными повторами SdrC, SdrD и SdrE, белков A и B, связывающих фибронектин (FnBpA, FnBpB), Cna (белок, связывающий коллаген) и SasG (поверхностный белок G *S. aureus*). Такие поверхностные антигены играют роль в колонизации ткани хозяина, уклонении от иммунного ответа хозяина и

приспособленности бактерии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0006] В данном документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с антигенами стафилококка, например, антигенами *S. aureus* или антигенами *S. pseudintermedius*. Данные антитела могут обладать одной или более из следующих характеристик: (a) характеризуется ослабленным связыванием Fc с белком A или гомологом белка A, таким как SpsQ; (b) содержит мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 (нумерация согласно индексу EU; эквивалентные H318R и Y319F под SEQ ID NO: 58); и (c) содержит тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58. Антитела связываются с антигенами стафилококка, например антигенами *S. aureus* или *S. pseudintermedius*, и, таким образом, являются применимыми в терапевтическом лечении стафилококковой инфекции и симптомов и состояний, ассоциированных со стафилококковой инфекцией или вызванных ею. В некоторых аспектах антитела направлены на антиген одного вида стафилококка, но могут перекрестно реагировать с другим видом стафилококка, например, антитело перекрестно реагирует с антигеном как *S. aureus*, так и *S. pseudintermedius*. Антитело может характеризоваться ослабленным связыванием Fc с белком SpsQ *S. pseudintermedius* и, таким образом, является применимым в терапевтическом лечении инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*, и симптомов и состояний, ассоциированных с инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*, или вызванных ею. В некоторых аспектах антитела демонстрируют антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека.

[0007] В некоторых аспектах антитела представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела, полностью лошадиные моноклональные антитела, полностью собачьи антитела, полностью кошачьи антитела, полностью свиные антитела, полностью бычьи антитела и т. д. Антитела, представленные в данном документе, оптимизируют в соответствии с видом по мере необходимости для применения у животного, которому требуется лечение. Антитела, представляющие интерес, включают гуманизированные антитела, или антитела, оптимизированные для применения у собак, оптимизированные для применения у кошек, оптимизированные

для применения у лошадей, оптимизированные для применения у быков, оптимизированные для применения у свиней и т. д., а также их варианты. Оптимизированные для применения у собак и оптимизированные для применения у кошек антитела являются полезными для применения у собак и кошек соответственно, и могут использоваться у других видов с учетом межвидовой гомологии Fc-области. Оптимизированные для применения у быков антитела являются полезными для применения у крупного рогатого скота, например, для лечения мастита и других стафилококковых инфекций.

[0008] Иллюстративные антигены *S. aureus*, к которым получают антитела, включают IsdA, IsdB, IsdC, IsdE, IsdH, белок A, ClfA, ClfB, CP5, CP8, SdrC, SdrD, SdrE, FnBpA, FnBpB, Cna, полисахарид поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG) и SasG. Таким образом, в некоторых аспектах антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи, который специфически связывается с антигеном *S. aureus*, выбранным из группы, состоящей из IsdA, IsdB, IsdC, IsdE, IsdH, белка A, ClfA, ClfB, CP5, CP8, SdrC, SdrD, SdrE, FnBpA, FnBpB, Cna, полисахарида поли-N-ацетилглюкозамина (PNAG) и SasG.

[0009] Иллюстративные антигены *S. pseudintermedius*, к которым получают антитела, включают любые поверхностные белки, такие как, например, SpsA, SpsQ и SpsR.

[0010] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с белком A *S. aureus*. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает одной или более из следующих характеристик:

(a) демонстрирует константу диссоциации (K_D), составляющую менее 10^{-9} , как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связывается со штаммом Newman WT *S. aureus* со значением EC_{50} , составляющим менее 10^{-9} ;

(c) демонстрирует комплементзависимое уничтожение *S. aureus*;

(d) снижает нагрузку на почки *S. aureus* на 3-5 log по сравнению с необработанными мышами в модели диссеминированной инфекции;

(e) демонстрирует антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека;

(f) перекрестно реагирует с *S. aureus*, *S. intermedius* и/или *S. pseudintermedius*;

(g) облегчает взаимодействия между Fab антител VH3 и *S. aureus*, экспрессирующим белок A; и

(h) содержит последовательность тяжелой цепи hIgG1 под SEQ ID NO: 58 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 18, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 26, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 20/22/24/28/30/32.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку A или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 18, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 26 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID

NO: 18/26, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 60, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 68, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 62/64/66/70/72/74.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 60, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 68 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 60/68, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 80, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 88, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 82/84/86/90/72/93.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело к белку А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 80, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 88 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 80/88, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0020] В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 76 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 78 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0021] В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 95 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

последовательности с ней. В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 97 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с IsdA *S. aureus*. В некоторых аспектах антитело к IsdA обладает одной или более из следующих характеристик:

- (a) демонстрирует константу диссоциации (K_D), составляющую менее 10^{-8} , как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
 - (b) снижает нагрузку на почки *S. aureus* на 3-5 log по сравнению с необработанными мышами в модели диссеминированной инфекции;
 - (c) демонстрирует антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека;
- и
- (d) содержит последовательность тяжелой цепи hIgG1 под SEQ ID NO: 58 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16.

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 99, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 107, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 101/103/105/109/111/113.

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 99, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 107 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 99/107, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0029] В некоторых аспектах антитело к IsdA содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 115 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых аспектах антитело к IsdA содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 117 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0030] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с IsdB *S. aureus*. В некоторых аспектах антитело к IsdB обладает одной или более из следующих характеристик:

- (a) связывается со штаммом Newman WT *S. aureus* с показателем EC₅₀, составляющим менее 10⁻¹⁰;
- (b) снижает нагрузку на почки *S. aureus* у обработанных мышей в приблизительно 1000 раз;
- (c) демонстрирует комплементзависимое уничтожение *S. aureus*;
- (d) демонстрирует антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека;
- (e) содержит последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 54 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней; и
- (f) содержит последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 52 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0031] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB содержит (а) три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 34, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 42, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и (b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи hIgG1 под SEQ ID NO: 58 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48.

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 42 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 34/42, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 54 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 52, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB содержит (а) три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 119, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 127, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и (b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи hIgG1 под SEQ ID NO: 58 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 под SEQ ID NO: 121/123/125/129/131/133.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 119, аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 127 и/или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 119/127, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 135 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитело к IsdB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 137, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0041] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут применяться для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариабельности последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении структурных областей петли, а определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. *См., например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[0042] В данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к *S. aureus* или их фрагменты, описанные в данном документе. Например, в данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблицах 1 и 15; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой

кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0043] Также в данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблицах 1 и 15; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0044] Также в данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR, перечисленных в таблицах 1 и 15, и любую из аминокислотных последовательностей LCDR, перечисленных в таблицах 1 и 15; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты CDR, перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0045] В данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* HCDR1, HCDR2, HCDR3), при этом набор аминокислотной последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител, перечисленных в таблицах 1 и 15.

[0046] Также в данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* LCDR1, LCDR2, LCDR3), при этом набор аминокислотной последовательности LCDR1,

LCDR2, LCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител, перечисленных в таблицах 1 и 15.

[0047] В данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблицах 1 и 15, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблицах 1 и 15. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом как HCVR, так и LCVR получены из одного и того же антитела, перечисленного в таблицах 1 и 15.

[0048] В данном документе представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к белку A, антитела к IsdA или антитела к IsdB. Например, это включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, указанных выше, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблицах 1 и 15. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы экспрессии, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование

антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[0049] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с белком А, IsdA или IsdB, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте композиция представляет собой комбинацию антитела к белку А и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к белку А обеспечивается преимущество.

[0050] В связанном аспекте композиция представляет собой комбинацию антитела к IsdA и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к IsdA обеспечивается преимущество.

[0051] В связанном аспекте композиция представляет собой комбинацию антитела к IsdB и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к IsdB обеспечивается преимущество.

[0052] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены терапевтические способы лечения стафилококковой инфекции, нарушений, ассоциированных со стафилококковой инфекцией, и/или симптомов стафилококковой инфекции. Терапевтические способы согласно данному аспекту включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, представленные в данном документе, характеризующиеся ослабленным связыванием Fc, субъекту, нуждающемуся в этом. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем влияния посредством уклонения от системы комплемента стафилококка и/или путем обеспечения индуцированного антителами уничтожения в сыворотке крови.

[0053] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены терапевтические способы лечения инфекции, вызванной *S. aureus*, нарушений, ассоциированных с инфекцией, вызванной *S. aureus*, и/или симптомов инфекции, вызванной *S. aureus*. Терапевтические способы согласно данному аспекту включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, представленные в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем влияния посредством уклонения от системы комплемента *S. aureus* и/или путем обеспечения индуцированного антителами уничтожения в сыворотке крови.

[0054] В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает терапевтические способы лечения инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*, нарушений, связанных с инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*, и/или симптомов инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*. Терапевтические способы согласно данному аспекту включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, представленные в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем влияния посредством уклонения от системы комплемента *S. pseudintermedius* и/или путем обеспечения индуцированного антителами уничтожения в сыворотке крови.

[0055] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0056] На **фигуре 1** показано влияние модификации */* антител к IsdB и антител к белку A на связывание со штаммом Newman дикого типа *S. aureus* и штаммами, дефицитными по белку A, для характеристики специфичности связывания с антителом при наличии и при отсутствии белка A.

[0057] На **фигуре 2** продемонстрировано, что моноклональные антитела

hIgG1^{*/*} как к белку A, так и к IsdB способствуют уничтожению штамма Newman *S. aureus* в нормальной сыворотке крови человека.

[0058] На **фигуре 3** показана эффективность антитела к IsdB^{*/*} в отношении снижения нагрузки на почки *S. aureus* по сравнению с немодифицированным антителом к IsdB.

[0059] На **фигуре 4** продемонстрировано, что моноклональные антитела hIgG1^{*/*} как к белку A, так и к IsdB способствуют уничтожению штаммов Newman, N315 или MW2 *S. aureus* в нормальной сыворотке крови человека по сравнению с немодифицированными антителами.

[0060] На **фигуре 5** показана эффективность антител к IsdB^{*/*} и к белку A^{*/*} в отношении снижения нагрузки на почки *S. aureus* по сравнению с немодифицированными антителами.

[0061] На **фигуре 6** продемонстрировано, что для эффективности моноклональных антител hIgG1^{*/*} к IsdB и к белку A требуется компонент C3 комплемента.

[0062] На **фигуре 7** продемонстрировано, что для эффективности моноклональных антител hIgG1^{*/*} к IsdB и к белку A не требуются FcgRIIb/FcgRIII/FcgRIV с низкой степенью аффинности.

[0063] На **фигуре 8** показана эффективность моноклональных антител hIgG1^{*/*} к белку A, IsdA и IsdB в отношении стимуляции уничтожения штамма Newman *S. aureus* через 16 часов в сыворотке крови человека.

[0064] На **фигуре 9** показана эффективность моноклональных антител hIgG1^{*/*} к белку A, к IsdA и к IsdB в отношении снижения нагрузки на почки *S. aureus* при введении через один день после инфицирования.

[0065] На **фигуре 10** продемонстрирована выживаемость *S. aureus* в цельной крови человека, обработанной контрольным моноклональным антителом hIgG1^{*/*} по сравнению с моноклональными антителами hIgG1^{*/*} к белку A, к IsdA и к IsdB. Обработка контрольным антителом не влияла на жизнеспособность *S. aureus*, в то время как моноклональные антитела hIgG1^{*/*} к белку A, к IsdA и к IsdB

индуцировали антителозависимое уничтожение *S. aureus*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0066] Необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0067] Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемый в данном документе термин «приблизительно» при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения на не более чем 1%. Например, используемое в данном документе выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (*например*, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[0068] Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

[0069] Термин «антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой

дисульфидными связями (*т. е.* «молекул полного антитела»), а также их мультимеров (*например*, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Участки V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0070] Моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с антигеном стафилококка, представленные в данном документе, характеризуются ослабленным связыванием Fc с белком A (и/или SpsQ или другим гомологичным белком). По всему описанию настоящего изобретения это обозначается как «*/*» или «**» и относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 в соответствии с нумерацией согласно индексу EU. Мутации H435R и Y436F являются эквивалентными H318R и Y319F под SEQ ID NO: 58 тяжелой цепи hIgG1. В то время как положение мутации */* относится к H435R и Y436F в соответствии с нумерацией согласно EU, мутация */* может быть обнаружена в разных положениях в конкретной тяжелой цепи данного антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) в зависимости от длины последовательности вариабельного домена.

[0071] Например, мутации */* могут быть обнаружены в полноразмерной последовательности тяжелой цепи для H1xH20295P2 в положениях аминокислотных остатков 443/444 в SEQ ID NO: 54; для H1xH15135P в положениях аминокислотных остатков 444/445 в SEQ ID NO: 76; для H1xH15120P в положениях аминокислотных остатков 436/437 в SEQ ID NO: 95; для H1xH20207P в положениях аминокислотных остатков 439/440 в SEQ ID NO: 115; и для H1xH20286P в положениях аминокислотных остатков 436/437 в SEQ ID NO: 135.

[0072] В иллюстративном антителе H1H20295P2 без мутации */* аминокислотные остатки в положениях 443/444 соответствующей полноразмерной тяжелой цепи под SEQ ID NO: 50 представляют собой гистидин/тирозин.

[0073] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающий фрагмент) могут быть идентичными последовательностям зародышевого типа человека или могут быть естественно или искусственно модифицированы. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе прямого сравнения двух или более CDR.

[0074] В определенных вариантах осуществления каркасные участки антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевого типа человека, например, идентичными последовательностям антител, представленным в данном документе, или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Одна или более аминокислот в данном каркасном участке (или один или более каркасных участков) могут быть заменены и замена(замены) может(могут) быть консервативной(консервативными) или неконсервативной(неконсервативными). Также возможны замена одного или более остатков CDR или удаление одного или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых для связывания можно обойтись без одной или двух CDR. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали участки контакта между антителами и их антигенами, исходя из опубликованных кристаллических структур, и сделали заключение, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не имеют аминокислотных остатков, вступающих в контакт с антигеном (см. также Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428). Таким образом, антитела, представленные в данном документе, могут быть эффективно модифицированы в участках CDR и/или каркасных участках, при условии, что модифицированное антитело сохраняет одну или более требуемых характеристик, связанных с эталонным антителом, в котором отсутствует модификация.

[0075] Модификации в данных CDR могут быть произведены в отношении последовательности CDR из антитела, представленного в данном документе, и модификации могут включать консервативные или неконсервативные замены. Требуемые замены могут быть определены с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. Например, один или более остатков CDR могут быть заменены аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей.

[0076] Кроме того, его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело, описанное в данном документе, но модифицированное так, чтобы пропускать один или более CDR и/или один или более каркасных участков, пока модифицированное антитело (также известное как антигенсвязывающий фрагмент) сохраняет способность связываться с соответствующим антигеном *S. aureus*.

[0077] Остатки CDR, которые не вступают в контакт с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не требуются) среди участков CDR согласно Kabat, находящихся за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. При удалении CDR или его остатка(остатков), обычно происходит замена аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирическим путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

[0078] Моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном стафилококка и характеризуются ослабленным связыванием Fc с белком A (и/или SpsQ, или другим гомологичным белком), описанные в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии или по

сравнению с последовательностями, представленными в данном документе. Такие модификации или мутации могут быть без труда определены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными из, например, общедоступных баз данных последовательностей антител, или путем сравнения аминокислотных последовательностей с последовательностями антител, представленными в данном документе, например, любой из последовательностей антител, представленных в таблицах в примерах.

[0079] Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одного или более каркасных участков и/или участков CDR модифицированы с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) последовательности зародышевого типа, из которой антитело было получено, или с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) другой последовательности зародышевого типа, например, человека, собаки, кошки, быка, свиньи, лошади и т. д., или с получением консервативной аминокислотной замены соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательностей в данном документе в совокупности называются «мутациями зародышевого типа»), или по сравнению с аминокислотными последовательностями антител, представленных в данном документе, например, с любой из последовательностей антител, представленных в таблицах, включенных в примеры, при условии, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент сохраняет требуемые характеристики относительно эталонного антитела. Специалист средней квалификации в данной области техники, исходя из раскрытых в данном документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки из каркасного участка и/или CDR в доменах V_H и/или V_L подвергнуты обратной мутации до остатков, присутствующих в первоначальной последовательности зародышевой

линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергнуты обратной мутации до первоначальной последовательности зародышевой линии, *например*, только подвергнутые мутации остатки, присутствующие в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, присутствующие в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков из каркасного участка и/или CDR подвергнуты мутации до соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) другой последовательности зародышевой линии (*т. е.*, последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально было получено антитело). Кроме того, антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных участках и/или участках CDR, *например*, при этом определенные отдельные остатки подвергнуты мутации до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшение специфичности связывания, повышение аффинности связывания, улучшение или усиление биологических антагонистических или агонистических свойств (в случае необходимости), снижение иммуногенности и т. п. Настоящее изобретение охватывает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа.

[0080] Также в данный документ включены полностью человеческие антитела, полностью бычьи антитела, полностью собачьи антитела, полностью лошадиные антитела и т. д. к антигенам *S. aureus*, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, содержащих одну или более консервативных замен. Например, антитела к белку А могут содержать аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или

CDR, содержащие, *например*, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе; антитела к IsdA могут содержать аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, содержащие, *например*, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе; и антитела к IsdB могут содержать аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, содержащие, *например*, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, раскрытых в данном документе.

[0081] Выражение «человеческое антитело», используемое в данном документе, предназначено для включения антител, содержащих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека; аналогичным образом антитело может быть оптимизировано в соответствии с видом с целью применения для лечения конкретного животного. Антитела, оптимизированные в соответствии с видом, могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые соответствующими последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии данного вида (*например*, за счет мутаций, вводимых с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или введения соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3.

[0082] Термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, не предназначен для включения моноклональных антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего (*например*, мыши), привиты на человеческие последовательности FR. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у млекопитающего, не относящегося к человеку, или в клетках млекопитающего, не относящегося к человеку,. Термин не подразумевает включение антител, выделенных от человека-субъекта или полученных в его организме.

[0083] Используемый в данном документе термин «оптимизированный в соответствии с видом каркасный участок» (например, оптимизированный для применения у собак или человеческий) относится к аминокислотной последовательности тяжелой цепи и легкой цепи собачьего антитела, отличной от остатков гипервариабельной области, определенных в данном документе как остатки CDR. Выражение «оптимизированное в соответствии с видом антитело», используемое в данном документе, относится к антителу, содержащему аминокислотные последовательности человеческих CDR, например, в обеих цепях и видоспецифичном каркасном участке. Другими словами, оптимизированное в соответствии с видом антитело содержит видоспецифичную тяжелую цепь IgG, содержащую CDR антитела первого вида (например, CDR человеческого антитела) и легкую цепь каппа второго вида, содержащую CDR антитела первого вида, и указывает на то, что оптимизированное в соответствии с видом антитело содержит тяжелую цепь IgG от второго вида (или модифицированный IgG, например, как описано в данном документе), которая содержит указанные CDR антитела данного первого вида вместо ее CDR, и легкую цепь каппа второго вида (или модифицированную легкую цепь каппа собаки), которая содержит указанные CDR антитела первого вида вместо ее CDR.

[0084] Термин «рекомбинантный», используемый в данном документе, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам согласно настоящему изобретению, которые созданы, экспрессированы, выделены или получены с помощью технологий или способов, известных из уровня техники, таких как, например, технология рекомбинантной ДНК, которая включает, *например*, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не относящегося к человеку (в том числе у трансгенных млекопитающих, не относящегося к человеку, *например*, трансгенных мышей), или в клеточной системе экспрессии (*например*, клетках CHO), или они выделены из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

[0085] Термин «специфически связывает» или «специфически связывается с» или ему подобный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в

физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать с помощью равновесной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-7} М или меньше (*например*, меньшее значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны из уровня техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т. п. Описанные в данном документе антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, BIACORE™, которые специфически связываются с антигенами стафилококка, но характеризуются ослабленным связыванием Fc с белком А и/или SpsQ или другим гомологичным белком. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним антигеном стафилококка и одним или более дополнительными антигенами или биспецифическими антителами, которые связываются с двумя разными антигенами стафилококка, тем не менее, считаются антителами, которые «специфически связываются», как используется в данном документе.

[0086] Термин «высокоаффинное» антитело относится к тем моноклональным антителам, которые характеризуются аффинностью связывания с антигеном стафилококка, таким как антиген *S. aureus*, выраженной в виде K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-7} М; предпочтительно 10^{-8} М; более предпочтительно 10^{-9} М, еще более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, что измерено при помощи поверхностного плазмонного резонанса, *например*, BIACORE™, или ELISA с определением сродства в растворе.

[0087] Термин «медленная скорость диссоциации», « K_{off} » или « k_d » означает диссоциацию комплекса антитела и антигена при константе скорости, составляющей $1 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, что определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса, *например*, BIACORE™.

[0088] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или

генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемый в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с антигеном стафилококка, а также демонстрируют ослабленное связывание Fc с белком A или гомологичным белком. Такие термины могут также относиться к одному или более фрагментам антитела, которые перекрестно реагируют с, например, *S. aureus* и *S. pseudintermedius*, или связываются с антигеном *S. pseudintermedius*, и также демонстрируют ослабленное связывание Fc с SpsQ.

[0089] В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с компонентом, таким как лиганд или терапевтический компонент («иммуноконъюгат»), такой как антибиотик, второе антитело к антигену стафилококка или любой другой терапевтический компонент, применимый для лечения инфекции, вызванной стафилококком.

[0090] Термин «выделенное антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения антитела, которое по сути не предусматривает других антител (Ab), имеющих другие антигенные специфичности (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывается с антигеном стафилококка, или его фрагмент, который по сути не предусматривает антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от указанного антигена стафилококка).

[0091] «Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «ADCC» представляет собой механизм клеточноопосредованной иммунной защиты, посредством чего эффекторная клетка иммунной системы активно лизует клетку-мишень, поверхностные мембранные антигены которой связаны специфичными антителами, такими как те, которые описаны в данном документе. Таким образом, это является одним механизмом, посредством которого, например, антитело, специфичное по отношению к *S. aureus*, или антитело *S. pseudintermedius* могут ограничивать распространение инфекции. Классическая ADCC опосредована

естественными клетками-киллерами (NK-клетками), макрофагами, нейтрофилами и, в некоторых случаях, эозинофилами.

[0092] Термин «поверхностный плазмонный резонанс», используемый в данном документе, относится к оптическому феномену, который делает возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[0093] Используемый в данном документе термин «K_D» предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[0094] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известном как паратоп. Один антиген может содержать более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными участками на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к сайту на антигене, в отношении которого отвечают В- и/или Т-клетки. Он также относится к участку антигена, с которым связывается антитело. Эпитопы можно определять как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно вносят вклад в аффинность взаимодействия. Также эпитопы могут быть конформационными, т. е. состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные структуры молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические характеристики трехмерных структур и/или специфические характеристики заряда.

[0095] Термин «перекрестно конкурирует», используемый в данном документе, означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с

антигеном и подавляют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию двух антител в обоих направлениях, *т. е.* первое антитело, которое связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с разными, но не перекрывающимися эпитопами таким образом, что связывание одного подавляет или блокирует связывание второго антитела, *например, посредством* стерического несоответствия. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью способов, известных из уровня техники, например, с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии. Для определения того, конкурирует ли перекрестно тестовое антитело с эталонным антителом, описанным в данном документе, эталонному антителу обеспечивают возможность связываться с антителом к антигену *S. aureus* в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с тем же антигеном. Если тестируемое антитело способно связываться с антигеном после насыщающего связывания с эталонным антителом, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается эталонное антитело. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с антигеном *S. aureus* после насыщающего связывания с эталонным антителом, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, который связан эталонным антителом по настоящему изобретению.

[0096] Термин «идентичность по сути» или «по сути идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой последовательностью нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной нитью), существует идентичность нуклеотидной последовательности, выражающаяся в %, например, составляет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере

89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична молекуле эталонной нуклеиновой кислоты, может в ряде случаев кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый молекулой эталонной нуклеиновой кислоты.

[0097] Применительно к полипептидам термин «существенный уровень сходства» или «по сути сходный» означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с применением значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности. В некоторых аспектах положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена по сути не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная доля или степень сходства можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой регулировки хорошо известны

специалистам в данной области. См., *например*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, которая включена в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

[0098] Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности с применением показателей сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., *например*, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (*например*,

FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и расчет процента идентичности последовательностей в областях с наибольшим перекрыванием между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), *выше*). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[0099] Выражение «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое приводит к требуемому эффекту, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[00100] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, например, млекопитающему, включая человека, нуждающемуся в снижении интенсивности проявления, предупреждении и/или лечении стафилококковой инфекции, такой как инфекция, вызванная *S. aureus*, или нарушения, связанного с инфекцией, вызванной *S. aureus*, или симптома, связанного с инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*, или нарушения, связанного с инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*, или симптома, связанного с инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*. Субъект может представлять собой человека или примата, отличного от человека, сельскохозяйственное животное, такое как лошадь, корова, коза, овца или свинья, или животное-компаньона. Выражение «животное-компаньон», используемое в данном документе, включает любое животное, отличное от человека, подходящее для содержания людьми в качестве домашнего питомца, включая собаку, кошку и грызуна. Термин «собака» включает животных-компаньонов и служебных собак. Термин «собака» является синонимом термина «представитель семейства псовых». Термин «кошка» включает тех, которые являются животными-компаньонами, известными как одомашненные кошки или домашние кошки, также известные как представители семейства

кошачьих. Термин «грызун» включает без ограничения хомяков, мышей, крыс, морских свинок, песчанок, кроликов, ежей, хорьков, шиншилл и т. д. Субъект может также включать любое животное, содержащееся в неволе.

[00101] Субъект может страдать стафилококковой инфекцией или являться предрасположенным к развитию стафилококковой инфекции, например, инфекционного заболевания, вызванного *S. aureus*, или инфекционного заболевания, вызванного *S. pseudintermedius*. Субъекты, «предрасположенные к развитию стафилококковой инфекции», или субъекты, «которые могут иметь повышенный риск заражения стафилококковой инфекцией», представляют собой субъектов с ослабленной иммунной системой вследствие аутоиммунного заболевания, индивидуумов, перенесших ожоговую травму, индивидуумов с сахарным диабетом, пациентов, подвергшихся хирургическим вмешательствам, индивидуумов, перенесших ранение, индивидуумов с установленным катетером, пациентов, находящихся на диализе, индивидуумов, получающих иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органов), индивидуумов, пораженных синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), с определенными формами анемии, которые истощают или разрушают лейкоциты, индивидуумов, получающих лучевую или химиотерапию, или индивидуумов, страдающих нарушением воспалительного характера. Кроме того, повышенному риску подвержены субъекты чрезвычайно молодого или пожилого возраста. Любой субъект, вступающий в физический контакт или находящийся в тесной физической близости с инфицированным животным или пациентом-человеком, или подвергающийся попаданию биологических жидкостей или тканей от инфицированного животного или пациента-человека, обладает повышенным риском развития инфекционного заболевания, вызванного *S. aureus*, или инфекционного заболевания, вызванного *S. pseudintermedius*. Животные могут также быть предрасположенными к развитию заболевания по множеству вышеперечисленных причин или по причине того, что животное производит молоко, например, корова, коза, лошадь, овца, собака или кошка в период лактации.

[00102] Используемые в данном документе термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» относятся к снижению или уменьшению

тяжести стафилококковой инфекции, например, инфекционного заболевания, вызванного *S. aureus*, или инфекционного заболевания, вызванного *S. pseudintermedius*, по меньшей мере одного симптома или признака стафилококковой инфекции, например, инфекционного заболевания, вызванного *S. aureus*, или инфекционного заболевания, вызванного *S. pseudintermedius*, или состояния, связанного или обусловленного стафилококковой инфекцией, например, инфекционным заболеванием, вызванным *S. aureus*, или инфекционным заболеванием, вызванным *S. pseudintermedius*, обусловленному введением терапевтического средства, такого как антитело, предусмотренное в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. Термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т. е. у субъекта может отсутствовать инфекция или у него могут быть снижены или отсутствовать бактериальные титры при введении терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

[00103] Используемый в данном документе термин «предупреждение» связанной со стафилококком инфекции относится к снижению риска заражения субъекта связанной со стафилококком инфекцией в момент инфицирования. В некоторых аспектах риск заражения субъекта связанной со стафилококком инфекцией снижается на по меньшей мере 30% по сравнению с таковым у субъекта, который не подвергался введению выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифически связываются с антигеном стафилококка перед событием инфицирования. Более применимым является снижение риска на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или полное устранение риска по сравнению с таковым у субъекта, который не подвергался введению выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифически связываются с антигеном стафилококка перед инфицированием.

[00104] Используемое в данном документе выражение «снижение тяжести», используемое при упоминании стафилококковой инфекции, например,

инфекционного заболевания, вызванного *S. aureus*, или инфекционного заболевания, вызванного *S. pseudintermedius*, относится к уменьшению выраженности симптомов, которые демонстрирует субъект, зараженный стафилококковой инфекцией, например, инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*.

Применимым является снижение симптомов на по меньшей мере 30% по сравнению с симптомами, которые демонстрирует субъект, также зараженный стафилококковой инфекцией, например, инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*, но при этом субъект не подвергался введению выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифически связываются с антигеном стафилококка. Более применимым является снижение выраженности симптомов на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или полное устранение симптомов (т. е. субъект является излеченным от инфекционного заболевания, например, излеченным от сепсиса) по сравнению с субъектом, который не подвергался введению выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифически связываются с токсином, или поверхностной детерминантой *S. aureus*, или их комбинацией перед инфицированием.

[00105] Некоторые или все из состояний и симптомов, связанных со стафилококковой инфекцией, могут предусматривать прямое действие секретируемых токсинов в качестве компонента инфекции или медиатора состояния или состояния заболевания, в то время как некоторые или все из состояний могут предусматривать не прямое или вторичное действие секретируемых токсинов (например, в качестве первичных факторов вирулентности, которые обуславливают основной симптом или большую часть симптомов, связанных с состоянием, или в качестве факторов, действие которых приводит к дальнейшему прогрессированию заболевания посредством нарушения клеточной функции или лизиса клетки).

[00106] Используемый в данном документе термин «антибиотик» относится к любому противомикробному средству или терапии, будь то химический препарат или биологическая терапия, применяемые при лечении, предупреждении или устранении стафилококковой инфекции у субъекта. Например,

антибиотик может быть выбран из группы, состоящей из пенициллина, оксациллина, рифампицина, флуклоксациллина, диклоксациллина, цефазолина, цефалотина, цефалексина, нафциллина, клиндамицина, линкомицина, линезолида, даптомицина, эритромицина, ванкомицина, гентамицина, доксициклина и триметоприма-сульфаметоксазола, или может представлять собой любой другой антибиотик, подходящий для лечения стафилококковой инфекции.

***Staphylococcus* и связанные с ним антигены**

[00107] Инфекционные заболевания, вызванные *S. aureus*, могут находиться в диапазоне от легких кожных инфекций до тяжелых инфекционных заболеваний, включающих сепсис и эндокардит. Поскольку бактерии все чаще встречаются в форме, устойчивой к лекарственному средству, в частности, в учреждениях здравоохранения, таких как больницы и клиники, существует необходимость в альтернативных способах лечения.

[00108] *S. aureus* известен своей способностью уклоняться от иммунной системы хозяина посредством экспрессии белка А. Функции белка А состоят в связывании с Fc-частью антител хозяина и предупреждении опосредованного антителом уничтожения бактерий, что влияет на вирулентность бактерий. Кроме того, белок А связывается с Fc-областью IgG1 и предупреждает связывание комплемента.

[00109] *Staphylococcus pseudintermedius* в первую очередь выявляют у собак и выявляют у кошек, лошадей и людей. *S. pseudintermedius*, как правило, ограничивается кожной инфекцией (пиодермией), но также выявляется при послеоперационной инфекции. SpsQ является ортологом белка А, который функционирует аналогично белку А и характеризуется 70% идентичностью с белком А. *S. pseudintermedius* обладает высокой степенью устойчивости к метициллину (MRSP).

[00110] Чтобы минимизировать влияние связывания Fc с белком А в данном документе представлены антитела к разнообразным антигенам *S. aureus*, характеризующиеся ослабленным связыванием Fc с белком А. В некоторых аспектах антитела содержат мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 (нумерация согласно индексу

EU; эквивалентны H318R и Y319F под SEQ ID NO: 58). В некоторых аспектах антитела содержат тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58. Аналогичным образом, чтобы минимизировать влияние связывания Fc с SpsQ в данном документе представлены антитела, которые перекрестно реагируют с *S. pseudintermedius* и характеризуются ослабленным связыванием Fc с SpsQ.

[00111] В данном документе раскрыты антитела, включающие оптимизированные в соответствии с видом антитела, такие как человеческие, гуманизированные, собачьи, оптимизированные для применения у собак, бычьи, оптимизированные для применения у быков и/или химерные формы антител, а также их фрагменты, производные/конъюгаты и композиции на их основе, которые связываются с антигенами стафилококка, такими как антигены поверхностной детерминанты и секретируемые токсины. Такие антитела могут быть применимы для выявления и/или визуализации бактерий стафилококка, таких как *S. aureus* и *S. pseudintermedius*, и, следовательно, могут быть применимы в диагностических способах и анализах. Антитела, описанные в данном документе, также взаимодействуют с поверхностными детерминантами стафилококка, тем самым препятствуя колонизации и уклонению от иммунной системы, что делает антитела применимыми для способов терапии и профилактики. Аналогичным образом, антитела, описанные в данном документе, могут связываться с секретируемыми токсинами стафилококка, тем самым снижая вирулентность стафилококковой инфекции.

[00112] В качестве иллюстрации, *S. aureus* экспрессирует антигены, которые являются важными для колонизации, уклонения от иммунной системы и приспособленности *S. aureus*. Такие антигены *S. aureus* включают, например, IsdA, IsdB, IsdC, IsdE, IsdH, белок A, ClfA, ClfB, CP5, CP8, SdrC, SdrD, SdrE, FnBpA, FnBpB, Cna, полисахарид поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG) и SasG. Антитела, представленные в данном документе, могут нацеливаться на данные антигены и, в частности, хорошо подходят для нацеливания на специфический антиген с учетом мутации IgG1*/*, способствующей ослаблению связывания Fc с белком A. Другие бактерии стафилококка экспрессируют сходные антигены, на которые антитела, представленные в данном документе, могут нацеливаться в комбинации с мутацией,

способствующей ослаблению связывания Fc с белком А или гомологичным белком.

[00113] *S. aureus* также продуцирует большое количество секретируемых и ассоциированных с клеткой белков, многие из которых участвуют в патогенезе, такие как альфа-токсин (АТ), бета-токсин, гамма-токсин, дельта-токсин, лейкоцидин, токсин синдрома токсического шока (TSST), энтеротоксины, коагулаза, белок А и фибриноген. Альфа-токсин представляет собой один из факторов вирулентности *S. aureus* и продуцируется большинством из патогенных штаммов *S. aureus*.

[00114] Инфекция, вызванная *S. aureus*, как используется в данном документе, относится к любой, от незначительной до серьезной колонизации субъекта бактериями *S. aureus*. Инфекция, вызванная *S. aureus*, может являться острой или хронической. Иллюстративные состояния, обусловленные инфекцией, вызванной *S. aureus*, включают целлюлит, бактериемию, некроз кожи, инфекцию век, инфекцию глаз, неонатальный конъюнктивит, остеомиелит, импетиго, фурункулы, синдром ошпаренной кожи, отравление пищевыми продуктами, пневмонию, послеоперационную инфекцию, ожоговую инфекцию, инфекцию мочевыводящих путей, менингит, эндокардит, септицемию, синдром токсического шока и инфекционный артрит. Иллюстративные симптомы инфекции, вызванной *S. aureus*, включают зуд, покраснение, сыпь, отечность, тошноту, рвоту, диарею, обезвоживание, снижение кровяного давления, лихорадку, спутанность сознания, боли в мышцах, боль в животе, опухание суставов и боль в суставах.

[00115] Оптимизированные в соответствии с видом антитела и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном документе, специфически связываются с антигенами стафилококка, например, антигенами *S. aureus*, такими как белок А, IsdA и IsdB, и демонстрируют ослабленное связывание Fc с белком А и/или SpsQ. Данные антитела связываются с соответствующим антигеном с высокой степенью аффинности и могут опосредовать антителозависимое уничтожение *S. aureus*. Данные антитела могут также опосредовать антителозависимое уничтожение *S. pseudintermedius*.

[00116] В некоторых вариантах осуществления антитела являются применимыми для лечения субъекта, страдающего от инфекции, вызванной *S. aureus*,

или для предупреждения инфекции, вызванной *S. aureus*. При введении субъекту антитела могут снижать бактериальную нагрузку, например, в сыворотке крови и почках. Антитела можно применять в целях профилактики (до инфицирования) для защиты субъекта от инфекции или можно применять в терапевтических целях (после развития инфекции) для облегчения ранее развившейся инфекции или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией.

[00117] В некоторых вариантах осуществления антитела являются применимыми для лечения субъекта, страдающего от инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*, или для предупреждения инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*. При введении субъекту антитела могут снижать бактериальную нагрузку, например, в коже, сыворотке крови и почках. Антитела можно применять в целях профилактики (до инфицирования) для защиты субъекта от инфекции или можно применять в терапевтических целях (после развития инфекции) для облегчения ранее развившейся инфекции или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекцией.

[00118] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в данном документе, получают от мышей, иммунизированных с помощью первичного иммуногена, такого как полноразмерный белок A, полноразмерный белок IsdA или полноразмерный белок IsdB, или с помощью рекомбинантной формы соответствующего антигена или его фрагмента с последующей иммунизацией с помощью вторичного иммуногена. Иммуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент антигена *S. aureus* или ДНК, кодирующей его активный фрагмент.

[00119] Определенные антитела, раскрытые в данном документе, способны связываться с *S. aureus* и снижать бактериальную нагрузку, как определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по настоящему изобретению связываться с антигеном *S. aureus* можно измерить с использованием любой стандартной методики, известной специалистам в данной области техники, включая анализы связывания или анализы активности, описанные в данном документе.

[00120] Определенные антитела, раскрытые в данном документе, обладают способностью связываться с *S. pseudintermedius* и снижать бактериальную нагрузку, как определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*.

[00121] Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примере 3 данного документа. В примере 3 константы аффинности связывания и диссоциации иллюстративных антител к антигенам *S. aureus* определяли с помощью Biacore. В примере 4 представлена специфичность связывания с антителом в присутствии белка А. В примерах 5 и 6 эксперименты *in vitro* и *in vivo* проводили с целью демонстрации способности антител обеспечивать индуцированное антителами уничтожение и снижение бактериальной нагрузки в почках соответственно.

[00122] Антитела, представленные в данном документе, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности. В одном варианте осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, выявляемую при помощи МРТ. В определенных вариантах осуществления такие меченые антитела можно использовать в диагностических исследованиях, в том числе в диагностических исследованиях с визуализацией.

Антитела IgG1*/*

[00123] Сообщалось (Jendeberg, L. et al. (1997) J. Immunological Meth. 201:25-34), что неспособность IgG3 связываться с белком А определяли одним аминокислотным остатком, Arg435 (нумерация согласно EU; Arg95 по IMGT), соответствующее положение которого в других подклассах IgG занято гистидиновым остатком. В данном документе предусмотрены антитела, содержащие

последовательности IgG1, в которых His435 подвергнут мутации до Arg. Также в данном документе предусмотрены антитела, содержащие последовательности IgG1, в которых Tyr436 подвергнут мутации до Phe. Дополнительно в данном документе предусмотрены антитела, содержащие последовательности IgG1, в которых His435 подвергнут мутации до Arg и Tyr436 подвергнут мутации до Phe. Таким образом, такие мутации в IgG1 обеспечивают получение антител, специфичных в отношении *S. aureus*, характеризующихся ослабленным связыванием Fc с белком A и/или SpsQ. Данная модификация упоминается в данном документе как IgG1^{*/*} и обозначает модифицированный IgG1, содержащий две описанные мутации (H435R/Y436F, известные как hIgG1^{*/*}; PMCID: 4675964, Smith et al., Sci Rep. 2015; 5: 17943). Полученная мутантная последовательность IgG1 в участке, прилежащем к участку изменения, является идентичной последовательности IgG3 и, следовательно, можно ожидать, что она будет являться иммунологически «невидимой», поскольку будут отсутствовать ненативные короткие пептиды, доступные для представления Т-клеткам, таким образом ослабляя потенциальную иммуногенность.

[00124] В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток 435 (т. е. в соответствии с нумерацией согласно индексу EU) из константной области тяжелой цепи заменен Arg, результатом чего является ослабленное связывание Fc-домена антитела с антигеном *S. aureus*. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток 436 (т. е. в соответствии с нумерацией согласно индексу EU) из константной области тяжелой цепи заменен Phe, результатом чего является ослабленное связывание Fc-домена антитела с антигеном *S. aureus*. В некоторых вариантах осуществления оба аминокислотных остатка 435 и 436 из константной области тяжелой цепи заменены Arg и Phe соответственно, результатом чего является ослабленное связывание Fc-домена антитела с антигеном *S. aureus*. В данном документе раскрыты антитела к антигенам *S. aureus*, характеризующиеся ослабленным связыванием Fc с белком A и/или SpsQ. В некоторых аспектах антитела содержат тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58, содержащую мутации H318R и Y319F, описанные в данном документе.

[00125] Оптимизированное в соответствии с видом антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, могут быть

подвергнуты мутациям в Fc-области, которые способствуют ослаблению связывания белка А (или гомологичного белка) с Fc-областью данного оптимизированного в соответствии с видом антитела.

Антитела к белку А и их антигенсвязывающие фрагменты

[00126] Белок А представляет собой белок с молекулярной массой 42 кДа, который существует как в секретируемой, так и в связанной с мембраной форме, обладает двумя различными видами активности связывания Ig: каждый домен может связываться с Fc γ , константной областью IgG, принимающей участие в осуществлении эффекторных функций, и Fab, фрагментом Ig, ответственным за распознавание антигена. Белок А ковалентно заякорен в клеточную стенку стафилококка с помощью своего карбоксильного конца. Белок состоит из пяти повторяющихся доменов (E, D, A, B, C), связанных с клеточной поверхностью посредством области H γ , и каждый домен может связываться с высокой степенью аффинности с Fc-областью иммуноглобулина G и с Fab-областью иммуноглобулина подкласса VH3. Взаимодействие с Fc IgG препятствует осуществлению эффекторной функции. Более того, антитела, связанные с белком А посредством Fc-области, не могут стимулировать процесс связывания комплемента по классическому пути.

[00127] В данном документе предусмотрены антитела к белку А, характеризующиеся ослабленным связыванием с Fc. Такие антитела содержат аминокислотные последовательности HCVR и аминокислотные последовательности LCVR, представленные в таблицах 1 и 15, а также могут содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG1 под SEQ ID NO: 58. Данная последовательность IgG1 содержит мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 (нумерация согласно индексу EU; эквивалентны H318R и Y319F под SEQ ID NO: 58).

[00128] В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения антитела к белку А перечислены в таблицах 1, 2, 15 и 16 данного документа. В таблицах 1 и 15 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1,

LCDR2 и LCDR3) иллюстративного антитела к белку А, из которого могут быть получены антитела по настоящему изобретению. В таблицах 2 и 16 представлены идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из иллюстративного антитела к белку А.

[00129] В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком А, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 60 и 80, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00130] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком А, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 68 и 88, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00131] В данном документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком А, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), включающих аминокислотную последовательность HCVR к белку А, перечисленную в таблице 1 или таблице 15, и аминокислотную последовательность LCVR к белку А, перечисленную в таблице 1 или таблице 15. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащиеся в иллюстративных антителах к белку А, перечисленных в таблице 1 или таблице 15. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 60/68 и 80/88.

[00132] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком А, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащиеся в любом из иллюстративных антител к белку А, перечисленных в таблицах 1 и 15. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32, 62-64-66-70-72-74 или 82-84-86-90-72-93.

[00133] В соответствующем варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком А, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенной иллюстративными антителами к белку А, перечисленными в таблицах 1 и 15. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком А, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 18/26, 60/68 и 80/88.

[00134] В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 76 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 78 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00135] В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 95 или по сути

сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых аспектах антитело к белку А содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 97 или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00136] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут применяться для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариабельности последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении структурных областей петли, а определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. См., *например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[00137] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к белку А или их части. Например, в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности HCVR к белку А и аминокислотные последовательности LCVR к белку А, перечисленные в таблицах 1 и 15; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR к белку А и последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR к белку А, перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00138] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей CDR к белку А, перечисленных в таблицах 1 и 15; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты CDR к белку А, перечисленных в таблицах 2 и 16, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00139] Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено иллюстративными антителами к белку А, перечисленными в таблицах 1 и 15.

[00140] Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено иллюстративными антителами к белку А, перечисленными в таблицах 1 и 15.

[00141] Также представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к белку А. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблицах 1 и 15. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы экспрессии, а также способы

получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[00142] Настоящее изобретение включает антитела к белку А, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, содержащегося в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Антитела к IsdA и их антигенсвязывающие фрагменты

[00143] Контролируемый железом белок поверхностной детерминанты А (IsdA) представляет собой белок *S. aureus*, принимающий участие в поглощении гема в качестве источника железа для бактерии. Белок IsdA также принимает участие в адгезии *S. aureus*, например, к эпителиальным клеткам человека. Сверхэкспрессия IsdA стимулирует рост *S. aureus* и защищает от различных бактерицидных действий со стороны иммунной системы хозяина.

[00144] В данном документе предусмотрены антитела к IsdA, характеризующиеся ослабленным связыванием Fc с белком А и/или SpsQ. Такие антитела содержат аминокислотные последовательности HCVR и аминокислотные последовательности LCVR, представленные в таблице 1 и таблице 25, а также могут содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG1 под SEQ ID NO: 58. Данная последовательность IgG1 содержит мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 (нумерация согласно индексу EU; эквивалентны H318R и Y319F под SEQ ID NO: 58).

[00145] В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения перечень антител к IsdA представлен в таблицах 1, 2, 25 и 26 данного документа. В таблицах 1 и 25 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2

и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к IsdA, из которых могут быть получены антитела согласно настоящему изобретению. В таблицах 2 и 26 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к IsdA.

[00146] В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 99, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00147] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 107, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00148] В данном документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотную последовательность HCVR, перечисленную в таблице 1 или таблице 25, и аминокислотную последовательность LCVR, перечисленную в таблице 1 или таблице 25. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащиеся в иллюстративных антителах к IsdA, перечисленных в таблице 1, или пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащиеся в иллюстративных антителах к IsdA, перечисленных в

таблице 25. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR представляет собой SEQ ID NO: 2/10. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR представляет собой SEQ ID NO: 99/107.

[00149] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащиеся в любом из иллюстративных антител к IsdA, перечисленных в таблице 1 или таблице 25. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит SEQ ID NO: 101-103-105-109-111-113.

[00150] В соответствующем варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенной для иллюстративных антител к IsdA, перечисленных в таблице 1 или таблице 25. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие набор аминокислотной последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащейся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10. Аналогичным образом, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdA, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 99/107.

[00151] В некоторых аспектах антитело к IsdA содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 115. В некоторых аспектах

антитело к IsdA содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 117. См. таблицу 27.

[00152] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут применяться для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариабельности последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении структурных областей петли, а определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. См., *например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[00153] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к IsdA или их части. Например, в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности HCVR к IsdA и аминокислотные последовательности LCVR к IsdA, перечисленные в таблице 1 и таблице 25; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR к IsdA и последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR к IsdA, перечисленных в таблице 2 или таблице 26, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00154] В настоящем изобретении также представлены молекулы

нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей CDR к IsdA, перечисленных в таблице 1 или таблице 25; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты CDR к IsdA, перечисленных в таблице 2 или таблице 26, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00155] Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено для иллюстративных антител к IsdA, перечисленных в таблице 1 или таблице 25.

[00156] Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено для иллюстративных антител к IsdA, перечисленных в таблице 1 или таблице 25.

[00157] Также представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к IsdA. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблицах 1 и 25. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы экспрессии, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[00158] Настоящее изобретение включает антитела к IsdA, имеющие

модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, содержащегося в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Антитела к IsdB и их антигенсвязывающие фрагменты

[00159] *S. aureus* захватывает гемоглобин на поверхности бактерии с помощью IsdB, другого контролируемого железом белка поверхностной детерминанты (Isd). Инактивация IsdB снижает связывание гемоглобина с клеточной стенкой бактерии и нарушает способность *S. aureus* использовать гемоглобин в качестве источника железа.

[00160] В данном документе представлены антитела к IsdB, характеризующиеся ослабленным связыванием Fc с белком A и/или SpsQ. Такие антитела содержат аминокислотные последовательности HCVR и аминокислотные последовательности LCVR, представленные в таблицах 1 и 25, а также дополнительно могут содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG1 под SEQ ID NO: 58. Данная последовательность IgG1 содержит мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 (нумерация согласно индексу EU; эквивалентны H318R и Y319F под SEQ ID NO: 58). В некоторых аспектах антитело к IsdB содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах антитело к IsdB содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 52. См. таблицу 3. В некоторых аспектах антитело к IsdB содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 135. В некоторых аспектах антитело к IsdB содержит аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 137. См. таблицу 27.

[00161] В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения перечень антител к IsdB в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения представлен в таблицах 1, 2, 25 и 26 данного документа. В таблице 1 представлены

идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративного антитела к IsdB, из которого могут быть получены антитела согласно настоящему изобретению. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративного антитела к IsdB.

[00162] В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 119, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00163] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 127, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00164] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности HCVR, перечисленные в таблице 1, в паре с аминокислотными последовательностями LCVR, перечисленными в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в иллюстративном антителе к IsdB, перечисленном в таблице 1. В определенных вариантах осуществления пара

аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR представляет собой SEQ ID NO: 34/42.

[00165] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащиеся в любом из иллюстративных антител к IsdB, перечисленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48.

[00166] В соответствующем варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных иллюстративными антителами к IsdB, перечисленными в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под: SEQ ID NO: 34/42.

[00167] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности HCVR, перечисленные в таблице 25, в паре с аминокислотными последовательностями LCVR, перечисленными в таблице 25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в иллюстративном антителе к IsdB, перечисленном в таблице 25. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR представляет собой SEQ ID NO:

119/127.

[00168] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащиеся в любом из иллюстративных антител к IsdB, перечисленных в таблице 25. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит SEQ ID NO: 121-123-125-129-131-133.

[00169] В соответствующем варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие набор из шести CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных иллюстративными антителами к IsdB, перечисленными в таблице 25. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с IsdB, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под: SEQ ID NO: 119/127.

[00170] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут применяться для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариативности последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении структурных областей петли, а определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. *См., например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд. (1991); Al-

Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[00171] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к IsdB или их части. Например, в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности HCVR к IsdB и аминокислотные последовательности LCVR к IsdB, перечисленные в таблицах 1 и 25; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR к IsdB и последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR к IsdB, перечисленных в таблице 2 и таблице 26, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00172] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей CDR к IsdB, перечисленных в таблицах 1 и 25; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты CDR к IsdB, перечисленных в таблицах 2 и 26, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00173] Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотной последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено иллюстративным антителом к IsdB, перечисленным в таблице 1, или иллюстративным антителом к IsdB, перечисленным в таблице 25.

[00174] Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (*т. е.* LCDR1-LCDR2-

LCDR3), где набор аминокислотной последовательности LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено иллюстративным антителом к IsdB, перечисленным в таблице 1, или иллюстративным антителом к IsdB, перечисленным в таблице 25.

[00175] Также представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к IsdB. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблице 1 и таблице 25. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы экспрессии, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[00176] Настоящее изобретение включает антитела к IsdB, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, содержащегося в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Дополнительные варианты Fc

[00177] В дополнение к вариантам */*, описанным выше, в данном документе предусмотрены некоторые дополнительные варианты Fc. В соответствии с определенными вариантами осуществления оптимизированные в соответствии с видом антитела к представленному антигену стафилококка будут подвергаться модификации в Fc-области антитела для ослабления связывания с белком A или гомологичным белком, подходящим для соответствующего вида животного.

[00178] В соответствии с определенными вариантами осуществления

представлены антитела к антигенам *S. aureus*, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с FcRn-рецептором, *например*, при кислотном значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к антигенам *S. aureus*, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-области Fc-домена, где мутация(мутации) повышает(повышают) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (*например*, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (*например*, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (*например*, M428L) и 434S (*например*, N434S); модификацию 428L, 259I (*например*, V259I) и 308F (*например*, V308F); модификацию 433K (*например*, H433K) и 434 (*например*, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (*например*, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (*например*, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (*например*, 308F или 308P).

[00179] Например, антитела к антигенам *S. aureus* содержат Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (*например*, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (*например*, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (*например*, M428L и N434S); а также 433K и 434F (*например*, H433K и N434F). Объемом настоящего изобретения предусмотрены все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-домene и другие мутации в вариабельных доменах антитела, раскрытых в данном документе.

[00180] Антитела к антигенам *S. aureus*, описанные в данном документе, могут содержать модифицированный Fc-домен, обладающий измененной эффекторной функцией, например, повышенной или сниженной эффекторной

функцией. Используемое в данном документе выражение «модифицированный Fc-домен, обладающий измененной эффекторной функцией», означает любую часть Fc иммуноглобулина, которая была модифицирована, подвергнута мутации, усечена и т. д. относительно встречающегося в природе Fc-домена дикого типа так, что при применении молекулы, содержащей модифицированный Fc, наблюдается повышение или снижение тяжести или степени по меньшей мере одного эффекта, выбранного из группы, состоящей из уничтожения клеток (*например*, ADCC и/или CDC), активации комплемента, фагоцитоза и опсонизации, по сравнению с молекулой сравнения, включающей версию части Fc дикого типа, встречающуюся в природе. В определенных вариантах осуществления «модифицированный Fc-домен, обладающий измененной эффекторной функцией», представляет собой Fc-домен со сниженным или ослабленным связыванием с Fc-рецептором (*например*, FcγR). Иллюстративные модифицированные Fc-домены описаны в US 2006/0024298, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой G236A.

[00181] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-домен представляет собой вариант Fc из IgG1 или вариант Fc из IgG4, содержащий замену в шарнирной области. Например, модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может включать вариант Fc из IgG1, в котором по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc из IgG1 заменена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc из IgG2. В качестве альтернативы, модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может включать вариант Fc из IgG4, в котором по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc из IgG4 заменена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc из IgG2. Неограничивающие иллюстративные модифицированные Fc-области, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, представлены в публикации заявки на патент США № 2014/0243504, описание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в ней также представлены любые функционально эквивалентные варианты модифицированных Fc-областей.

[00182] Другие модифицированные Fc-домены и модификации Fc,

которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают любые модификации, представленные в US 2014/0171623; US 8697396; US 2014/0134162; WO 2014/043361, описание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способы конструирования антител или других антигенсвязывающих слитых белков, содержащих модифицированный Fc-домен, описанных в данном документе, известны в данной области техники.

Получение человеческих антител

[00183] Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте настоящего изобретения для создания антител человека, которые специфически связываются с антигенами *S. aureus*. Иммуноген, содержащий любой антиген *S. aureus*, такой как белок A, IsdA и IsdB, может использоваться для получения антител. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных с помощью антигена *S. aureus* или ДНК, кодирующей антиген или его фрагмент. В качестве альтернативы, антиген или его фрагмент можно получить с применением стандартных биохимических методик, а также модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления иммуноген представляет собой полученный рекомбинантным путем белок A, IsdA или IsdB или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноген может представлять собой коммерчески доступный антиген. В определенных вариантах осуществления можно вводить одну или более бустерных инъекций. В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать один или более коммерчески доступных антигенов. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный антиген, экспрессируемый в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[00184] С применением технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител сначала выделяют химерные

антитела с высокой аффинностью к антигенам *S. aureus*, содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие переменные области тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышиных константных областей, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем экспрессируют ДНК в клетке, способной к экспрессии полностью человеческого антитела.

[00185] Как правило, мыши VELOCIMMUNE® вводят представляющий интерес антиген, и от мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы с получением immortalized линий клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с константными областями требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок, представляющий собой антитело, может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[00186] Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Мышиные константные области заменяют на требуемую человеческую константную область с получением полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, модифицированного

IgG1^{*/*}, описанного в данном документе. Несмотря на то, что отобранная константная область может быть различной в зависимости от конкретного применения, характеристики, касающиеся высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи вариабельной области.

Биологические эквиваленты

[00187] Антитела к антигенам *стафилококка* и фрагменты антител, описанные в данном документе, охватывают белки, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с определенным антигеном, характеризующуюся ослабленным связыванием с Fc. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, однако проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело по настоящему изобретению, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по сути являются биологическими эквивалентами антитела или фрагмента антитела по настоящему изобретению.

[00188] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень поглощения которых значительно не отличаются при введении одинаковой молярной дозы в сходных экспериментальных условиях в случае либо однократной дозы, либо множества доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их поглощения, но не по скорости их поглощения, и все еще могут считаться биологическими эквивалентами, поскольку такие различия в скорости поглощения предусмотрены и отражены в информации по лекарственному препарату, не являются необходимыми для достижения в организме эффективных концентраций

лекарственного средства, *например*, при длительном применении, и считаются не значимыми с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[00189] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или активности.

[00190] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если пациента можно перевести один или более раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска возникновения побочных эффектов, в том числе значимого с клинической точки зрения изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности по сравнению с таковой при продолжении терапии без такого перевода.

[00191] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

[00192] Биологическую эквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения степени биологической эквивалентности включают, *например*, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в виде зависимости от времени; (b) тест *in vitro* который коррелировал с данными биологической доступности *in vivo* у человека и с достаточной точностью предсказывал их; (c) тест *in vivo* у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в виде зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

[00193] Биологические эквиваленты антител по настоящему изобретению

можно конструировать с помощью, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей, или осуществления делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антитела, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, *например*, мутации, которые обеспечивают устранение или исключают гликозилирование.

Картирование эпитопов, домены связывания и родственные методики

[00194] Настоящее изобретение включает антитела к антигенам стафилококка, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, находящимися в пределах конкретного белка стафилококка, к которому получали антитело, *например*, к антигенам *S. aureus*, таким как белок A, IsdA или IsdB. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности, состоящей из 3 или более (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах антигена (*например*, линейного эпитопа в домене). В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах антигена (*например*, конформационный эпитоп).

[00195] Разные методики, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для определения наличия «взаимодействия с одной или более аминокислотами» антитела в пределах полипептида или белка.

Иллюстративные методики включают, *например*, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие, как описаны в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк). Другие способы включают аланин-сканирующий мутагенез, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.*

248: 443-63), кристаллографические исследования с расщеплением пептидов и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстрагирование эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченным дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному дейтерий-водородному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности взаимодействия. В результате аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, проявлять относительно более высокие массы по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, за счет чего выявляют остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Chemistry* 267: 252-259; Engen и Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[00196] Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым вступают в реакцию В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут образовываться как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, сближенных за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные за счет укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8–10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[00197] Профилирование с модификацией (MAP), также известное как профилирование антител с модификацией структуры антигена (ASAP), представляет собой способ категоризации больших количеств моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, исходя из подобия профилей связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. US 2004/0101920, который, в частности, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Каждой категории может соответствовать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного в другой категории, либо частично перекрывается с ним. Данная технология обеспечивает возможность быстрого отбора генетически идентичных антител с тем, чтобы определение характеристик можно было сфокусировать на генетически разнородных антителах. При использовании в отношении скрининга гибридомы MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела с требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител по настоящему изобретению в группы антител, связывающих разные эпитопы.

[00198] В определенных вариантах осуществления антитела *S. aureus* или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах любой одной или более областей, представленных в конкретном антигене *S. aureus*, либо в природной форме, либо форме, полученной рекомбинантным путем, либо с его фрагментом.

[00199] Настоящее изобретение включает антитела к антигену *S. aureus*, которые связываются с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа этого специфического антигена. Аналогичным образом настоящее изобретение также включает антитела, которые конкурируют за связывание с антигеном *S. aureus* или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе.

[00200] Используя стандартные способы, известные в данной области техники, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы

определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к белку А по настоящему изобретению, обеспечивают возможность связывания эталонного антитела с белком А или пептидом белка А при насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с белком А. Если тестируемое антитело способно связываться с белком А после насыщающего связывания с эталонным антителом к белку А, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к белку А. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком А после насыщающего связывания с эталонным антителом к белку А, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается эталонное антитело к белку А, описанное в данном документе.

[00201] Для определения того, имеет ли место конкуренция за связывание с референтным антителом к белку А, описанную выше методику исследования связывания осуществляют в двух направлениях. В первом направлении обеспечивают возможность связывания эталонного антитела с белком А при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с белком А. Во втором направлении обеспечивают возможность связывания тестируемого антитела с белком А при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с белком А. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно к связыванию с белком А, то делают заключение, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с белком А. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может пространственно блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

[00202] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающим эпитопом, если каждое конкурентно подавляет (блокирует) связывание других антител с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела подавляет связывание других на по меньшей мере 50%, но предпочтительно на 75%,

90% или даже 99% согласно анализу конкурентного связывания (см., *например*, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела. Два антитела имеют перекрывающийся эпитоп, если некоторые аминокислотные мутации, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела.

[00203] В дальнейшем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (*например*, анализы с внесением в пептиды мутаций и анализы связывания) для того, чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено фактом связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или что причиной отсутствия наблюдаемого связывания является пространственное блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно проводить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, существующего в данной области техники.

Полиспецифические антитела

[00204] Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфичными в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении более чем одного целевого полипептида. См., *например*, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

[00205] Любые из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или их вариантов можно сконструировать с использованием стандартных молекулярно-биологических методик (*например*, методики рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области техники.

[00206] В некоторых вариантах осуществления антитела получают в биспецифическом формате («биспецифическое»), в котором переменные области, связывающиеся с разными антигенами *S. aureus*, соединены вместе для придания двухдоменной специфичности одной связывающей молекуле. Полученные соответствующим образом свойства биспецифичности могут усиливать общую ингибиторную эффективность посредством увеличения как специфичности, так и avidности связывания. Переменные области, специфичные в отношении отдельных доменов (*например*, сегменты N-концевого домена), или те, которые могут связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере для создания биспецифичности переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы со специфичностью в отношении одного домена подвергают рекомбинации с переменными областями легкой цепи (V_L) из ряда связывающих молекул со специфичностью в отношении второго домена для идентификации некогнатных партнеров V_L , которые можно объединять в пару с исходным V_H без нарушения первоначальной специфичности V_H . Таким же способом можно объединять отдельный сегмент V_L (*например*, V_{L1}) с двумя разными V_H -доменами (*например*, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих «плечей» ($V_{H1} - V_{L1}$ и $V_{H2} - V_{L1}$). Использование отдельного сегмента V_L уменьшает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность способов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

[00207] В качестве альтернативы антитела, которые связываются с несколькими доменами и второй мишенью, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к антигену *S. aureus*, можно получать в биспецифическом формате с использованием описанных в данном документе методик или других методик, известных специалисту в данной области техники. Переменные области антитела, связывающиеся с отличающимися областями, можно соединять вместе с переменными областями, которые связываются с соответствующими сайтами на, например, антигене *S. aureus*, для придания двойной

антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы.

Соответственно сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Вариабельные области, обладающие специфичностью в отношении внеклеточного домена, объединяют с вариабельной областью, обладающей специфичностью в отношении наружной части внеклеточного домена, и объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой вариабельной области связываться с отдельными антигенами.

[00208] Иллюстративное антитело в биспецифическом формате, которое можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение C_H3-домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_H3-домена второго иммуноглобулина Ig, где C_H3-домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где отличие, составляющее по меньшей мере одну аминокислоту, ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует отличие по аминокислотам. В одном варианте осуществления C_H3-домен первого Ig связывается с белком А, а C_H3-домен второго Ig содержит мутацию, которая способствует ослаблению или устранению связывания с белком А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT; H435R в соответствии с нумерацией согласно EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые могут присутствовать в пределах второго C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител на основе IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител на основе IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител на основе IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения.

[00209] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, *например*, биспецифические форматы на основе scFv или диател, продукты слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, структуру «выступы-во-

впадины», общую легкую цепь (*например*, общую легкую цепь со структурой «выступы-во-впадины» и т. п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-антитело, «лейциновую застежку», DuoBody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы на основе Mab² (в отношении обзора вышеизложенных форматов *см.*, *например*, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1—11, и источники, упоминаемые в данном документе). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, *например*, где не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой. (*См.*, *например*, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [*Epub*: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы

[00210] В настоящем изобретении представлены терапевтические композиции, содержащие антитела к стафилококку, раскрытые в данном документе, или их антигенсвязывающие фрагменты. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т. п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, хорошо известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTINTM), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа «масло в воде» и «вода в масле», эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. *См.* также Powell *et al.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00211] Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и

размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т. п. При использовании антитела по настоящему изобретению для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для предупреждения заболевания преимущественным является введение антитела по настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 60 мг/кг веса тела, более предпочтительно от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 60 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг или от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и длительность лечения. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в качестве начальной дозы, составляющей от по меньшей мере приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 300 мг или от приблизительно 10 мг до приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В определенных вариантах осуществления после начальной дозы может следовать введение второй дозы или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно тем же что и в начальной дозе, или меньше начальной дозы, где последующие введения доз разделены интервалом времени, составляющим от по меньшей мере 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

[00212] Известны различные системы доставки, которые можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, *например*, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., *например*, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный,

трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, при помощи инфузии или болюсной инъекции, абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (*например*, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т. д.), а также ее можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности, в липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

[00213] Применение наночастиц для доставки антитела по настоящему изобретению также предусмотрено в данном документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических путей применения. Наночастицы, конъюгированные с антителом, и способы их получения и применения подробно описаны в Arruebo, M., et al. 2009 («Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications» in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в данный документ посредством ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целенаправленного воздействия на инфицированные клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны в патентных документах, например, US 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен в данный документ во всей своей полноте.

[00214] Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) может использоваться для доставки антител, представленных в данном документе. См. WO/2018/226861, включенную в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления AAV содержит полинуклеотид, кодирующий терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Затем полинуклеотид последовательно интегрируется в геномный локус клеток субъекта, например, клеток вымени коровы, получающей лечение в отношении мастита, где полинуклеотид транскрибируется и продуцируется антитело. В одном варианте осуществления геномный локус представляет собой локус «безопасной гавани»,

который обеспечивает высокую экспрессию антитела, не препятствуя при этом экспрессии основных генов или не стимулируя экспрессию онкогенов или других генов, связанных с патологическими процессами. В одном варианте осуществления геномный локус представляет собой сайт аденоассоциированного вируса.

[00215] В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения пациента (коровы и т. д.) со стафилококковой инфекцией посредством введения пациенту вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело, предназначенное для применения для лечения.

[00216] В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в виде системы с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени для композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы.

[00217] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, интракраниальных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, для капельных инфузий и т. п. Эти инъекционные препараты можно получить с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получить, *например*, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемых для инъекций. Водной средой для инъекций, является, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т. п., которые можно применять в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (*например*, этанол), многоатомный спирт (*например*, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. п. В качестве масляной среды применяют, *например*, кунжутное масло, соевое масло и т. п., которые можно применять в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат,

бензиловый спирт и т. п. Полученным таким способом инъекционным составом предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

[00218] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению свободно можно применять устройство для доставки по типу шприца-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприца-ручки обычно применяют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж остался пустым, пустой картридж можно сразу удалить в отходы и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприца-ручки затем можно повторно применять. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприца-ручки сменный картридж отсутствует. Вместо этого одноразовое устройство для доставки по типу шприца-ручки предварительно заполнено фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После освобождения резервуара от фармацевтической композиции устройство удаляют в отходы целиком.

[00219] При подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многоразовые устройства для доставки по типу шприца-ручки и автоинъектора. Примеры включают, но, разумеется, без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь несколько из них. Примеры устройств для доставки в виде шприца-

ручки многоразового применения, используемых при подкожном введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но, разумеется, без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс), при этом упомянуты лишь несколько из них.

[00220] Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в виде лекарственных форм со стандартной дозой, подобранной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные составы (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 мг до приблизительно 500 мг на лекарственную форму со стандартной дозой; в частности в форме инъекционного состава; для других лекарственных форм предпочтительно, чтобы содержание антитела составляло от приблизительно 5 мг до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 мг до приблизительно 250 мг.

Пути терапевтического применения антител

[00221] Антитела по настоящему изобретению являются применимыми для лечения и/или предупреждения заболевания, или нарушения, или состояния, связанного со стафилококковой инфекцией, например, инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*, и/или для уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. Такое заболевание, нарушение или состояние может представлять собой целлюлит, бактериемию, некроз кожи, инфекцию век, инфекцию глаз, неонатальный конъюнктивит, остеомиелит, импетиго, фурункулы, синдром ошпаренной кожи, отравление пищевыми продуктами, пневмонию, послеоперационную инфекцию, инфекцию мочевыводящих путей, ожоговую инфекцию, менингит, эндокардит, септицемию, синдром токсического шока или

инфекционный артрит. В некоторых аспектах субъект имеет протез сустава, а антитела, раскрытые в данном документе, являются применимыми для лечения и/или предупреждения инфекции, вызванной *S. aureus*, ткани, окружающей протез сустава. В некоторых аспектах субъект имеет катетер, а антитела, раскрытые в данном документе, являются применимыми для лечения и/или предупреждения инфекции, вызванной *S. aureus*, катетера и/или ткани, окружающей катетер. В некоторых аспектах субъект имеет имплантированное инородное тело, а антитела, раскрытые в данном документе, являются применимыми для лечения и/или предупреждения инфекции, вызванной *S. aureus*, инородного тела и/или ткани, окружающей инородное тело. В некоторых аспектах субъект страдает от мастита, а антитела, раскрытые в данном документе, являются применимыми для лечения мастита.

[00222] В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются применимыми для лечения субъектов, страдающих от острой или хронической инфекции, вызванной *S. aureus* или *S. pseudintermedius*. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению применимы для уменьшения бактериальных титров или снижения бактериальной нагрузки в организме хозяина или в органах хозяина. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*.

[00223] Одно или более антител по настоящему изобретению можно вводить для ослабления, или предупреждения, или снижения тяжести одного или более симптомов или состояний, связанных с инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*. Антитела можно применять для облегчения или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *S. aureus*, или инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*, включающего без ограничения зуд, покраснение, сыпь, отечность, тошноту, рвоту, диарею, обезвоживание, снижение кровяного давления, лихорадку, спутанность сознания, боли в мышцах, боль в животе, опухание суставов и боль в суставах.

[00224] Также в данном документе предусмотрено применение одного или

более антител, представленных в данном документе, с профилактической целью для предупреждения инфекции, вызванной *S. aureus*, или инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*. Такой субъект может представлять собой пациента, подвергшегося хирургическому вмешательству, индивидуума, перенесшего ранение, или индивидуума, перенесшего ожоговую травму.

[00225] В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции, вызванной *S. aureus*, или инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют в качестве вспомогательной терапии с каким-либо другим средством или какой-либо другой терапией, известной специалисту в данной области техники, применимой для лечения или уменьшения тяжести инфекции, вызванной *S. aureus*, или инфекции, вызванной *S. pseudintermedius*.

Виды комбинированной терапии

[00226] Виды комбинированной терапии могут включать антитело к антигену стафилококка, представленное в данном документе, и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно преимущественно объединять с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению. Антитела согласно настоящему изобретению можно синергически объединять с одним или более лекарственными средствами или средствами, применяемыми для лечения стафилококковой инфекции.

[00227] Например, иллюстративные средства для лечения бактериальной инфекции могут включать, *например*, антибактериальное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство (такое как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), другое антитело к *S. aureus*, вакцину против *S. aureus* или средство паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной *S. aureus*.

[00228] Иллюстративные средства включают пенициллин, оксациллин, рифампицин, флуклоксациллин, диклоксациллин, цефазолин, цефалотин, цефалексин,

нафциллин, клиндамицин, линкомицин, линезолид, даптомицин, эритромицин, ванкомицин, гентамицин, доксициклин и триметоприм-сульфаметоксазол.

[00229] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в данном документе, можно объединять со вторым терапевтическим средством для снижения бактериальной нагрузки у пациента с инфекцией, вызванной *S. aureus*, или инфекцией, вызванной *S. pseudintermedius*, или для уменьшения тяжести одного или более симптомов инфекции.

[00230] В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой еще одно другое антитело или смесь антител, специфичные по отношению к одному или более антигенам стафилококка, где другое антитело или антитела в составе смеси могут связываться или не могут связываться с тем же антигеном, с которым связывается антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой антитело к другому белку стафилококка.

[00231] Используемое в данном документе выражение «в комбинации с» означает, что дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить до введения, одновременно или после введения по меньшей мере одного антитела к антигену стафилококка, предусмотренного в данном документе, или смеси, содержащей одно или более из антител, представленных в данном документе. Выражение «в комбинации с» также включает последовательное или совместное введение антитела, например, к *S. aureus*, и второго терапевтического средства.

[00232] Дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить субъекту до введения антитела к стафилококку по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным «перед» вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 часа до, за 60 часов до, за 48 часов до, за 36 часов до, за 24 часа до, за 12 часов до, за 6 часов до, за 5 часов до, за 4 часа до, за 3 часа до, за 2 часа до, за 1 час до, за 30 минут до, за 15 минут до, за 10 минут до, за 5 минут до или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах

осуществления дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить субъекту после введения антитела по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным «после» второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, через 5 минут после, через 10 минут после, через 15 минут после, через 30 минут после, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа после, через 4 часа после, через 5 часов после, через 6 часов после, через 12 часов после, через 24 часа после, через 36 часов после, через 48 часов после, через 60 часов после или через 72 часа после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела по настоящему изобретению. «Одновременное» введение для целей настоящего изобретения включает, *например*, введение антитела к стафилококку, такого как антитело к белку A, антитело к IsdA или антитело к IsdB, и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в единичной дозированной лекарственной форме, или в отдельных дозированных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 минут или менее относительно друг друга. При введении в виде отдельных дозированных лекарственных форм каждая дозированная лекарственная форма может быть введена посредством одного и того же пути (*например*, как антитело, так и дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен внутривенно и т. д.); в качестве альтернативы, каждая дозированная лекарственная форма может быть введена посредством разных путей (*например*, антитело может быть введено внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен перорально). В любом случае все способы введения компонентов в единичной дозированной лекарственной форме, в отдельных дозированных лекарственных формах или в виде отдельных дозированных лекарственных форм посредством разных путей введения считаются «одновременным введением» для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение антитела «перед», «одновременно» или «после» (согласно определениям данных терминов в данном документе, приведенным выше) введения дополнительного терапевтически

активного компонента считается введением антитела «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

[00233] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к *S. Aureus* по настоящему изобретению составлено вместе с одним или более из дополнительных терапевтически активных компонентов, описанных в других местах в данном документе.

Схемы введения

[00234] В соответствии с определенными вариантами осуществления однократная доза антитела, представленного в данном документе (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к антигену стафилококка и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в данном документе), можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения несколько доз антитела к антигену стафилококка (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к антигену стафилококка и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к антигену стафилококка по настоящему изобретению. Используемое в данном документе выражение «последовательное введение» означает, что каждую дозу антитела к антигену стафилококка вводят субъекту в разные моменты времени, *например*, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (*например*, часами, днями, неделями или месяцами). В настоящем изобретении представлены способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела к антигену стафилококка, затем одной или более вторичных доз антитела к антигену стафилококка, а затем необязательно одной или более третичных доз антитела к антигену стафилококка.

[00235] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антитела к антигену *S. aureus* по настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет

собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также обозначается как «исходная доза»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальной, вторичной и третичной доз могут содержать одинаковое количество антитела к антигену стафилококка, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако в определенных вариантах осуществления количество антитела к антигену стафилококка, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах отличается друг от друга (*например*, при необходимости корректируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве «насыщающих доз» с последующим введением последующих доз, которые вводят с меньшей частотой (*например*, «поддерживающих доз»).

[00236] В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят в течение от 1 до 48 часов (*например*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», используемая в данном документе, означает в контексте последовательности из нескольких введений дозу антитела к антигену стафилококка, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных введений доз.

[00237] Способы в соответствии с данным аспектом по настоящему изобретению могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела к антигену стафилококка. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более)

третичных доз.

[00238] В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать в ходе схемы лечения. Врач может корректировать частоту введения в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Пути применения антител в диагностике

[00239] Антитела к антигенам стафилококка, представленные в данном документе, могут применяться для обнаружения и/или измерения содержания, например, *S. aureus* или *S. pseudintermedius*, в образце, например, для диагностических целей. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено использование одного или более антител по настоящему изобретению в анализах для выявления заболевания или нарушения, такого как бактериальная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы для *S. aureus* или *S. pseudintermedius* могут включать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к антигену *S. aureus* по настоящему изобретению, где антитело к антигену *S. aureus* или *S. pseudintermedius* является меченым с помощью детектируемой метки или репортерной молекулы, или используется в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения *S. aureus* или *S. pseudintermedius* из образцов, полученных от пациента. В качестве альтернативы, немеченое антитело к антигену *S. aureus* или *S. pseudintermedius* может использоваться в диагностических путях применения в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченым детектируемой меткой. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения содержания *S. aureus* или *S. pseudintermedius* в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и

сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS).

[00240] Образцы, которые можно использовать в анализах для диагностики *S. aureus* или *S. pseudintermedius* в соответствии с настоящим изобретением, включают образец любой ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит детектируемое количество либо *S. aureus*, либо *S. pseudintermedius*, либо их фрагментов в нормальном или патологическом состоянии. Как правило, уровни *S. aureus* или *S. pseudintermedius* в конкретном образце, полученном от здорового пациента (*например*, пациента, не страдающего от заболевания, связанного с *S. aureus* или *S. pseudintermedius*, будут измеряться для начального определения исходного уровня или стандартного уровня *S. aureus* или *S. pseudintermedius*. Затем данный исходный уровень *S. aureus* или *S. pseudintermedius* можно сравнивать с уровнями *S. aureus* или *S. pseudintermedius*, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие или имеющих связанное с *S. aureus* состояние или симптомы, связанные с таким состоянием.

[00241] Антитела, специфичные по отношению к *S. aureus* или *S. pseudintermedius*, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности.

ПРИМЕРЫ

[00242] Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов средней квалификации в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции по настоящему изобретению, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к

используемым числам (например, количеству, температуре и т. п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

[00243] Для всех положений, рассмотренных в настоящем изобретении, нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat (Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, включен в данный документ посредством ссылки во всей полноте). Специалисты в данной области антител поймут, что это соглашение состоит из непоследовательной нумерации в конкретных областях последовательности иммуноглобулина, что позволяет нормализовать ссылку на консервативные положения в семействах иммуноглобулинов. Соответственно, положения любого из данных иммуноглобулинов, определенные по индексу EU, не обязательно будут соответствовать его непрерывной последовательности.

Пример 1. Получение антител к IsdA, антител к IsdB и антител к белку A

[00244] Антитела к IsdA и антитела к IsdB получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, двумя иммуногенами, IsdA-6x His и IsdB-6x His, содержащими рекомбинантный IsdA. Антитела к белку A получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, иммуногеном, содержащим белок A дикого типа или мутантный белок A (мутантная версия не связывает Fc и называется «SpAkkaa» (PMID: 23982075)).

[00245] Иммунный ответ антител контролировали с помощью антиген-специфического иммуноанализа, т. е. иммуноанализа, специфичного в отношении IsdA, IsdB или белка A. Когда достигается требуемый иммунный ответ, спленоциты могут быть собраны и слиты с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования линий клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы

могут быть подвергнуты скринингу и отобраны для идентификации клеточных линий, которые продуцируют специфические в отношении IsdA антитела, специфические в отношении IsdB антитела или специфические в отношении белка A антитела. С помощью такой методики можно получать химерные антитела (*m. e.*, антитела, содержащие переменные домены человека и константные домены мыши). В этом случае, однако, полностью человеческие антитела выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США 2007/0280945A1.

[00246] Константные области тяжелой цепи антитела представляют собой Fc-области IgG1 человека, содержащие аминокислотные замены Н в положении 435 на R, согласно EU (H435R), или замену Y в положении 436 на F, согласно EU (Y436F), или замену H435R и Y436F. Мутированная форма IgG1, имеющая две аминокислотные замены H435R и Y436F, в настоящем изобретении обозначается как */*. Мутации */* вводили в векторы экспрессии, используемые для создания полностью человеческих антител к белку A, IsdB или IsdA, представленных в таблице 1.

[00247] Некоторые биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами из данного примера, подробно описаны в примерах, представленных ниже.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой и легкой цепи антител к IsdA, антител к IsdB и антител к белку A

[00248] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных антител, представленных в настоящем документе. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в таблице 2. В таблице 3 представлены идентификаторы полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепи для двух антител к IsdB, одного с мутациями */* тяжелой цепи и другого без них.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1xH20334P2* /* (к IsdA)	2	4	6	8	10	12	14	16
H1xH15140P*/ * (к белку A)	18	20	22	24	26	28	30	32
H1xH20295P2* /* H1H20295P2W T (к IsdB)	34	36	38	40	42	44	46	48

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1xH20334P2* /* (к IsdA)	1	3	5	7	9	11	13	15
H1xH15140P*/ * (к белку A)	17	19	21	23	25	27	29	31
H1xH20295P2* /* H1H20295P2W T	33	35	37	39	41	43	45	47

(к IsdB)								
----------	--	--	--	--	--	--	--	--

Таблица 3. Идентификаторы последовательности для последовательностей полноразмерной тяжелой и легкой цепи для H1H20295P2 дикого типа (WT) и мутированной формы (*/*)

	SEQ ID NO:			
Обозначение антитела	Полноразмерная тяжелая цепь		Полноразмерная легкая цепь	
	Нуклеиновая кислота	Аминокислота	Нуклеиновая кислота	Аминокислота
H1H20295P2WT (к IsdB)	49	50	51	52
H1xH20295P2*/* (к IsdB*/*)	53	54	51	52

[00249] Антитела, представленные в данном документе, могут быть любого изотипа, если тяжелая цепь иммуноглобулина отличается от таковой немодифицированного родительского антитела к IgG*S. aureus* по меньшей мере двумя аминокислотными заменами: H435R и Y436F, по нумерации согласно индексу EU. Мутированная форма IgG1, имеющая две аминокислотные замены H435R и Y436F, в настоящем изобретении обозначается как */*. Антитела к IsdA, к IsdB и к белку A по настоящему изобретению могут содержать последовательности варибельного домена и CDR, как указано в таблицах 1 и 2, и человеческий Fc-домен изотипа IgG1, имеющий мутации H435R и Y436F в соответствии с SEQ ID NO: 58. Для определенных путей применения или экспериментов домен Fc может представлять собой домен Fc мыши. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, можно превращать в антитело с другим изотипом Fc, имеющим эквивалентные мутации H435R и Y436F (например, антитело с Fc мышинового IgG3 может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG1 */* и т. д.), но в любом случае варибельные домены (включая CDR), обозначенные числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 1 и 2,

останутся такими же, и ожидается, что связывающие свойства будут идентичными или по сути сходными независимо от природы домена Fc, поскольку присутствуют мутации H435R и Y436F.

Пример 3. Кинетика связывания Biacore модифицированных */* моноклональных антител к IsdA и антител к белку A, связывающихся с IsdA.6xHis и белком A, соответственно, измеренная при 25°C и 37°C

[00250] Константы равновесной диссоциации (K_D) для белка A и IsdA.6xHis реагентов, связывающихся с очищенными моноклональными антителами к IsdA */* и к белку A */* определяли с применением биосенсора Biacore T200 или биосенсора Biacore 4000 на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания проводили в подвижном буфере, состоящем из 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA и 0,05% об./об. Tween-20, pH 7,4 (HBS-EP) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали путем связывания амина с Fc моноклонального антитела к иммуноглобулину человека (GE Healthcare № по кат. BR100839) или человеческим специфическим Fcγ F(ab')₂ поликлональным антителом (Jackson ImmunoResearch № по кат. 109-006-008) для захвата моноклонального антитела к IsdA */* или белка A */*. Исследования связывания проводили для различных концентраций IsdA.6xHis (90-3,33 нМ; 3-кратное серийное разведение) и белка A (100 нМ-0,39 нМ; 4-кратное серийное разведение), полученных в подвижном буфере HBS-EP. Белки вводили на поверхность захваченного моноклонального антитела к IsdA */* и к белку A */* в течение 3-3,5 минут при скорости потока, составляющей 30-50 мкл/минута, в то время как диссоциацию моноклонального антитела, связанного с IsdA.6xHis, и реагента белка A контролировали в течение 5-10 минут в подвижном буфере HBS-EP. Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в режиме реального времени по модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с применением программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0c. Равновесную константу диссоциации связывания (K_D) и значения периодов полудиссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из кинетических скоростей следующим образом:

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

[00251] Кинетические параметры связывания для связывания IsdA.6xHis и белка А с моноклональным антителом к IsdA*/* и к белку А*/* по настоящему изобретению при 25°C и 37°C показаны в таблицах 4–7.

[00252] При 25°C моноклональные антитела к IsdA*/* связываются с IsdA.6xHis со значением K_D , составляющим 1,28 нМ, как показано в таблице 4. При 37°C моноклональные антитела к IsdA*/* связываются с IsdA.6xHis со значением K_D , составляющим 3,49 нМ, как показано в таблице 5.

[00253] При 25°C моноклональные антитела к белку А*/* связываются с белком А со значением K_D , составляющим 204 пМ, как показано в таблице 6. При 37°C моноклональные антитела к белку А*/* связываются с белком А со значением K_D , составляющим 98,6 пМ, как показано в таблице 7.

Таблица 4. Кинетические параметры связывания в отношении связывания IsdA.6xHis с моноклональными антителами к IsdA*/* при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 90 нМ Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1xH20334P2 */*	101,3±0,8	98	3,48E+05	4,46E-04	1,28E-09	26

Таблица 5. Кинетические параметры связывания в отношении связывания IsdA.6xHis с моноклональными антителами к IsdA*/* при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захват	Связано 90	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
-----------------	----------------	------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

	a mAb (RU)	nM Ag (RU)				
H1xH20334P2 */*	136,0±1,4	116	4,79E+05	1,67E-03	3,49E-09	7

Таблица 6. Кинетические параметры связывания для связывания белка А с моноклональными антителами к белку А*/* при 25°C

Захваче нное mAb	Урове нь захват а mAb (RU)	Связан о 100 нМ Ag(RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1xH15140P* /*	133 ± 0,7	44	3,81E+05	7,78E-05	2,04E-10	149

Таблица 7. Кинетические параметры связывания для связывания белка А с моноклональными антителами к белку А*/* при 37°C

Захваче нное mAb	Уровен ь захвата mAb (RU)	Связано 100 нМ Ag(RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1xH15140P* /*	51 ± 1,4	19	1,19E+06	1,17E-04	9,86E-11	99

Пример 4. Проведение ELISA *S. aureus* для оценки специфичности связывания антител в присутствии белка А

[00254] *S. aureus* экспрессирует белок, связывающийся с IgG, называемый белком А, на поверхности патогена. Белок А содержит 4-5 повторов домена, связывающегося с IgG, который характеризуется высокой аффинностью к Fc-части

человеческих антител IgG1, IgG2 и IgG4. См. Loghem et al., 1982, staphylococcal Protein A and human IgG subclasses and allotypes Scand. J. Immunol. 15, 275-278.

Человеческие антитела IgG3 содержат аминокислотные замены, что приводит к значительному снижению связывания белка А (H435R, Y436F, которые обозначаются */*). В данном анализе изучали специфичность связывания антител hIgG1 и hIgG1*/* с интактными штаммами *S. aureus* дикого типа, дефицитными по белку А.

[00255] Антитела к IsdB*/* и белку А*/* по настоящему изобретению оценивали в отношении связывания со штаммом Newman дикого типа *S. aureus* и штаммами, дефицитными по белку А, для определения характеристики специфичности связывания с антителом при наличии и при отсутствии белка А. В течение ночи культуры *S. aureus* выращивали в RPMI, промывали дважды с помощью PBS и затем ресуспендировали при OD=0,25. Планшеты для микротитрования Black Nunc покрывали 100 мкл/лунка суспензии *S. aureus* и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующее утро планшеты трижды промывали с помощью ADB (1% BSA в PBS) и блокировали в течение двух часов 200 мкл блокирующего буфера (3% BSA + 0,5% Tween 20 в PBS) при комнатной температуре. Затем планшеты трижды промывали с помощью ADB, а затем инкубировали с первичным антителом в указанной концентрации при комнатной температуре в течение одного часа. Вторичное антитело (куриное антитело к иммуноглобулину человека, конъюгированное с HRP) добавляли при разведении 1:4000 и инкубировали в течение 1 часа, после чего планшеты трижды промывали с помощью ADB. Субстрат Pico добавляли на 10 минут и планшеты считывали с помощью планшет-ридера для измерения люминесцентного сигнала.

[00256] Контроль hIgG1, в отличие от контроля hIgG1*/*, связывается со штаммом Newman *S. aureus* дикого типа зависимым от белка А образом (фиг. 1), демонстрируя широкий диапазон связывания изотипа hIgG1. Моноклональные антитела hIgG1 и hIgG1*/* к IsdB связываются аналогично штамму, дефицитному по белку А, что показывает, что модификации */* не влияют на связывание с мишенью. См. также таблицу 8.

Таблица 8. Результаты ELISA в отношении связывания *S. Aureus* с антителами в формате hIgG1 и hIgG1*/*

Антитело	Результаты ELISA в отношении EC50 связывания в log[M]	
	Штамм Newman WT <i>S. aureus</i>	Штамм Newman Δ spa WTS. <i>aureus</i>
Контроль с hIgG1 (REGN1932)	3,05E-11	Связывание отсутствует
hIgG1 к IsdB (H1H20295P2)	2,27E-11	3,01E-11
Контроль с hIgG1*/*(REGN4440)	1,90E-07	Связывание отсутствует
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2*/*)	3,14E-11	6,23E-11
hIgG1*/* к белку A (H1xH15140P)	1,54E-11	2,74E-09

Пример 5. Выживаемость *S. aureus* в сыворотке крови с сохраненным комплементом и индуцированное антителами уничтожение моноклональными антителами hIgG1*/*

[00257] *S. aureus* избегает комплементзависимого уничтожения за счет экспрессии факторов вирулентности, которые мешают активации комплемента на различных этапах до образования мембраноатакующего комплекса. См.

Thammavongsa, et al. 2015. staphylococcal manipulation of host immune responses, *Nat Rev Microbiol*, 13: 529-43. В данном случае тестировали способность антител преодолевать избегание комплемента и инициировать индуцированное антителами уничтожение в сыворотке крови.

[00258] Антитела hIgG1*/* к белку A и IsdB по настоящему изобретению оценивали в отношении их способности стимулировать уничтожение штамма Newman *S. Aureus* в нормальной сыворотке крови человека. Вкратце, культуру штамма Newman *S. aureus* выращивали в RPMI в течение ночи, промывали в PBS, и

ресуспендировали в RPMI + 0,05% BSA до концентрации, составляющей 1×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Нормальную сыворотку крови человека (NHS) размораживали на водяной бане при 37°C , а затем держали на льду, затем часть NHS удаляли для тепловой инактивации (HI) при 56°C в течение 30 минут. В трех повторностях 100 мкл суспензии *S. aureus* смешивали с тестируемым антителом в течение 10 минут, а затем добавляли 100 мкл указанной сыворотки крови для получения конечной концентрации 50% сыворотки крови и 100 мкг/мл моноклонального антитела. Затем тестируемые образцы инкубировали со встряхиванием (100 об./мин) при 37°C в течение 2, 4 или 6 ч. После инкубации к образцам добавляли 100 мкл лизирующего буфера для агглютинации (PBS с добавлением 200 Ед стрептокиназы, 2 мкг/мл РНКазы, 10 мкг/мл ДНКазы, 0,5% сапонины на мл PBS), интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Выживаемость *S. aureus* вычисляли по колониеобразующим единицам посредством серийных разведений и посева на чашках с TSA.

[00259] Результаты репрезентативного эксперимента показаны в таблице 9 и на фигуре 2. Ни изотипический контроль с hIgG1^{*/*}, ни антитела в формате hIgG1 к IsdB не влияли на выживаемость *S. aureus* в NHS, в то время как и моноклональные антитела hIgG1^{*/*} к белку A, и к IsdB со временем способствовали уничтожению. Тепловая инактивация снижала активность антистафилококковых антител hIgG1^{*/*}, что предполагает, что для антителозависимого уничтожения требуется комплемент.

Таблица 9. Выживаемость штамма Newman *S. aureus* в сыворотке крови человека при обработке антителами к IsdB^{*/*} и к белку A^{*/*}

Антитела (100 мкг/мл) инкубация в течение 6 часов	КОЕ/мл		Стандартное отклонение	
	NHS	HI сыворотки крови	NHS	HI сыворотки крови
PBS	3,5E+05	4,3E+05	1,2E+05	2,2E+05
Контроль с hIgG1 ^{*/*} (REGN4440)	2,5E+05	3,5E+05	1,4E+05	9,0E+04

hIgG1*/* к белку A (H1xH15140P)	8,5E+03	4,8E+05	2,2E+03	1,2E+05
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2)	6,0E+03	3,8E+05	1,5E+03	2,0E+05
hIgG1 к IsdB (H1H20295P2)	2,8E+05	4,3E+05	8,0E+04	9,0E+04

Пример 6. Тестирование антител в формате hIgG1 и hIgG1*/* к IsdB в модели диссеминированной инфекции, вызванной *S. aureus*

[00260] *S. aureus* вызывает диссеминированную инфекцию у мышей при внутрибрюшинном введении с высокими уровнями репликации бактерий в почках. См. Wang and Lee, 2016, Murine Models of Bacteremia and Surgical Wound Infection for the Evaluation of *Staphylococcus aureus* Vaccine Candidates, *Methods Mol Biol*, 1403: 409-18. В данном эксперименте антитела к IsdB в формате hIgG1 и hIgG1*/* тестировали в отношении их способности снижать нагрузку на почки при введении через 1 день после инфицирования *S. aureus*.

[00261] Антитела H1xH20295P2 и H1H20295P2*/* к IsdB по настоящему изобретению оценивали в отношении терапевтической эффективности в отношении штамма Newman *S. aureus* в модели диссеминированной инфекции. Вкратце, культуру штамма Newman *S. aureus* выращивали в TSB в течение ночи, пересекали и выращивали до среднелогарифмической фазы ($OD_{600}=1$). Культуру затем промывали в PBS дважды и ресуспендировали в PBS при оптической плотности, составляющей 3 ($7,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкл бактериальной суспензии. Через один день после инфицирования мышей обрабатывали 5 мг/кг или 10 мг/кг моноклонального антитела в PBS, как указано, при введении 100 мкл подкожно. За мышами наблюдали в отношении потери веса и состояния тела до 4 дней после инфицирования, после чего их умерщвляли. Почки удаляли и ресуспендировали в 0,1% Triton X100 в PBS и гомогенизировали, используя пробирки для диссоциации C-mach. Бактерии подсчитывали по колониеобразующим единицам путем серийного разведения и посева на чашках с TSA.

[00262] Результаты двух независимых экспериментов представлены в таблице 10. Моноклональное антитело к IsdB в формате hIgG1*/* снижало нагрузку на почки *S. aureus* на 3-4 log, в то время как формат hIgG1 того же антитела оказался

неэффективным для снижения нагрузки *S. aureus* по сравнению с изотипическим контролем. См. также фигуру 3.

Таблица 10. Нагрузка на почки *S. aureus* у мышей, обработанных антителами

Антитело	Эксперимент 1 (5 мг/кг моноклонального антитела)		Эксперимент 2 (10 мг/кг моноклонального антитела)	
	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение
Контроль с PBS	2,9E+08	1,5E+08	1,1E+08	1,9E+08
Контроль с hIgG1(REGN1932)	4,4E+07	1,7E+07	5,9E+07	4,0E+07
Контроль с hIgG1*/*(REGN4440)	1,1E+08	1,1E+08	1,5E+07	1,2E+07
hIgG1 к IsdB (H1H20295P2)	5,5E+07	4,2E+07	4,6E+07	2,2E+07
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2)	3,8E+04	1,3E+05	1,1E+03	1,0E+03

Пример 7. Индуцированное антителами уничтожение *S. aureus* с помощью моноклональных антител hIgG1*/* в нормальной сыворотке крови человека

[00263] Как описано выше в примере 5, антитела в данном эксперименте тестировали в отношении их способности преодолевать избегание бактериального комплемента и инициировать индуцированное антителами уничтожение в сыворотке крови нескольких штаммов *S. aureus*, включая штамм Newman MSSA и клинические изоляты MRSA N315 и MW2. См. Kuroda, M., et al., Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2001. 357(9264): p. 1225-40. Baba, T.,

et al., Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002. 359(9320): p. 1819-27.

[00264] Антитела hIgG1*/* к белку A и к IsdB оценивали в отношении их способности стимулировать уничтожение штамма Newman, N315 или MW2 *S. aureus* в нормальной сыворотке крови человека. Культуры *S. aureus* выращивали в RPMI в течение ночи, промывали в PBS и ресуспендировали в RPMI + 0,05% BSA до концентрации, составляющей 1×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Нормальную сыворотку крови человека (NHS) размораживали на водяной бане при 37°C, а затем хранили на льду. В трех повторностях 100 мкл суспензии *S. aureus*, суспензии штамма Newman, N315 или MW2 *S. aureus* соответственно смешивали с тестируемыми антителами и 100 мкл указанной сыворотки добавляли до конечной концентрации 50% сыворотки и 100 мкг/мл моноклональных антител. Тестируемые образцы затем инкубировали со встряхиванием (100 об./мин) при 37°C в течение шести часов. После инкубации к образцам добавляли 100 мкл лизирующего буфера для агглютинации (PBS с добавлением 200 Ед стрептокиназы, 2 мкг/мл РНКазы, 10 мкг/мл ДНКазы, 0,5% сапонины на мл PBS), интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение десяти минут. Выживаемость *S. aureus* вычисляли по колониеобразующим единицам посредством серийных разведений и посева на чашках с TSA.

[00265] Данные показаны в таблице 11. Контрольные антитела, моноклональные антитела hIgG1 к IsdB и hIgG1 к белку A не влияли на выживаемость штаммов *S. aureus* в нормальной сыворотке крови человека, в то время как и моноклональные антитела hIgG1*/* к белку A, и hIgG1*/* к IsdB способствовали уничтожению через шесть часов. Индуцированное антителом уничтожение с помощью противостафилококковых моноклональных антител hIgG1*/* к белку A и к IsdB в нормальной сыворотке крови человека было сходным для штамма MSSA Newman и клинических изолятов MRSA N315 и MW2. См. также фигуру 4.

Таблица 11. Выживаемость *S. aureus* в сыворотке крови человека при обработке антителами к IsdB и к белку A

Антитела (100 мкг/мл) инкубация в течение 6 часов	Штамм NewmanS. <i>aureus</i>		Штамм N315S. <i>aureus</i>		Штамм MW2S. <i>aureus</i>	
	КОЕ/мл	стандартн ое отклонени е	КОЕ/мл	стандартн ое отклонени е	КОЕ/мл	стандартн ое отклонени е
<i>S. aureus</i> + сыворотка крови	2,75E+0 5	5,00E+04	6,50E+0 5	2,50E+04	6,25E+0 5	5,00E+04
Контроль с hIgG1(REGN1932)	1,75E+0 5	2,89E+04	8,75E+0 5	1,77E+05	5,75E+0 5	1,44E+04
Контроль с hIgG1*/*(REGN44 40)	1,50E+0 5	2,89E+04	8,25E+0 5	6,61E+04	7,25E+0 5	1,01E+05
hIgG1 к IsdB (H1H20295P2)	1,75E+0 5	2,50E+04	4,75E+0 5	8,78E+04	5,75E+0 5	5,77E+04
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2)	6,25E+0 4	2,89E+03	4,75E+0 4	1,66E+04	6,25E+0 4	3,82E+03
hIgG1 к белку А (REGN6410)	2,75E+0 5	7,64E+04	2,00E+0 5	5,00E+04	5,25E+0 5	0,00E+00
hIgG1*/* к белку А (H1xH15140P)	4,25E+0 4	6,29E+03	6,00E+0 4	9,01E+03	6,50E+0 4	1,88E+04

Пример 8. Тестирование антител в формате hIgG1 и hIgG1*/*к IsdB и к белку А в модели диссеминированной инфекции *S. aureus*

[00266] Используя ту же модель диссеминированной инфекции *S. aureus*, упомянутую в примере 6, были протестированы как антитела hIgG1, так и hIgG1*/* к IsdB и к белку А в отношении их способности снижать нагрузку на почки при введении через один день после инфицирования *S. aureus*.

[00267] Антитела H1xH20295P2 и H1H20295P2 к IsdB(hIgG1*/*) и H1xH15140P и REGN6410 (H1H15140P) к белку А (hIgG1*/*) оценивали в отношении

терапевтической эффективности в отношении штамма Newman *S. Aureus*. Культуру Newman *S. aureus* выращивали в TSB в течение ночи, пересекали и выращивали до среднелогарифмической фазы ($OD_{600}=1$). Культуру затем промывали в PBS дважды и ресуспендировали в PBS при оптической плотности, составляющей $3 (7,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкл бактериальной суспензии. Через один день после инфицирования мышей обрабатывали 10 мг/кг моноклонального антитела в PBS, как указано, при введении 100 мкл подкожно. За мышами наблюдали в отношении потери веса и состояния тела до 4 дней после инфицирования, после чего их умерщвляли. Почки удаляли и ресуспендировали в 0,1% Triton X100 в PBS и гомогенизировали, используя пробирки для диссоциации C-mach. Бактерии подсчитывали по колониеобразующим единицам путем серийного разведения и посева на чашках с TSA.

[00268] Результаты представлены в таблице 12. Моноклональные антитела в формате hIgG1*/* к IsdB и к белку A снижали нагрузку на почки *S. aureus* на 3-4 log, в то время как формат hIgG1 тех же антител оказался неэффективным для снижения нагрузки *S. aureus* по сравнению с изотипическим контролем. См. также фигуру 5, представляющую результаты из двух независимых экспериментов.

Таблица 12. Нагрузка на почки *S. aureus* у мышей, обработанных антителами

Антитело	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение
PBS	1,2E+08	1,7E+08
Контроль с hIgG1*/*(REGN4440)	4,1E+07	1,3E+08
Контроль с hIgG1(REGN1932)	2,8E+07	1,2E+08
hIgG1 к IsdB (H1H20295P2)	9,7E+06	9,9E+07
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2)	6,3E+04	1,2E+05
hIgG1 к белку A (REG6410-H1H15140P)	2,5E+06	9,9E+07
hIgG1*/* к белку A (H1xH15140P)	1,4E+04	1,3E+05

Пример 9. Обработка с терапевтической целью на мышинной модели диссеминированной инфекции с использованием мышей дикого типа и нокаутированных мышей

[00269] Антитела IgG1 человека могут указывать на разрушение бактерий посредством эффекторной функции путем привлечения компонента C1q системы комплемента и/или иммунных клеток, экспрессирующих FcγR. См. Lu, et al., *Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases*. Nat Rev Immunol, 2018, 18(1): 46-61. C1q инициирует классический путь комплемента для индуцирования фагоцитоза посредством рецепторов комплемента, образование литического мембраноатакующего комплекса и дополнительный рекрутинг клеток врождённой иммунной системы. C3 является крайне важным компонентом пути комплемента, необходимого для активности. См. Dobo, et al., *Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases*. Front Immunol, 2018, 9: 1851. FcγR экспрессируются на различных иммунных клетках, а взаимодействие Fc/FcγR hIgG1 может приводить к фагоцитозу, дегрануляции, клеточной цитотоксичности и высвобождению хемоаттрактантов. Мышиные FcγRIII и FcγRIV способствуют активации иммунных клеток, которые играют ключевую роль в эффекторной функции. См. Bruhns, P. and F. Jonsson, *Mouse and human FcR effector functions*. Immunol Rev, 2015, 268(1): 25-51.

[00270] *S. aureus* вызывает диссеминированную инфекцию у мышей при внутрибрюшинном введении с высокими уровнями репликации бактерий в почках. Как описано выше в примерах 6 и 8, моноклональные антитела в формате hIgG1*/* к IsdB и к белку A оказались способными снижать нагрузку на почки *S. aureus* в то время как формат hIgG1 тех же антител оказался неэффективным. Таким образом, избегая связывания белка A с Fc, антитела hIgG1*/* получают способность стимулировать эффекторную функцию, поскольку активность не зависит исключительно от связывания Fab с бактериями посредством переменных доменов.

[00271] Кроме того, как показано в примерах 5 и 7, моноклональные антитела hIgG1*/* к белку A и к IsdB способствовали уничтожению стафилококков в нормальной сыворотке крови человека. Для выяснения того, требуется ли комплемент

или FcgR для эффективности моноклональных антител в формате hIgG1** in vivo, оценивали нагрузку на почки *S. aureus* у мышей дикого типа с дефицитом C3 или у нокаутированных мышей FcgRIIb/FcgRIII/FcgRIV после обработки моноклональным антителом при 10 мг/кг. Антибиотик даптомицин был включен в качестве контрольной группы обработки, так как этот антибиотик непосредственно разрушает мембрану бактериальной клетки и не требует эффекторной функции. Heidary, et al., *Daptomycin*. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(1): 1-11.

[00272] Описанные в данном документе антитела к IsdB H1xH20295P2 и к белку A H1xH15140P оценивали в отношении терапевтической эффективности в отношении штамма Newman *S. aureus* в модели диссеминированной инфекции с использованием мышей с дефицитом комплемента и FcgR. Мышей с дефицитом комплемента получали путем прямой замены мышинового гена C3 репортером LacZ. Нокаутированных мышей C3^{-/-} сравнивали с контрольными совместно содержащимися однопометниками C3^{+/+}. Для мышей с дефицитом FcgR были получены нокаутированные мыши FcgRIIb/FcgRIII/FcgRIV путем прямой замены мышинных генов Fcgr2, Fcgr3, Fcgr4 геном устойчивости к неомицину. Мышей с нокаутом FcgRIIb/FcgRIII/FcgRIV сравнивали с мышами с соответствующими фоновыми параметрами дикого типа (VG), которые представляют собой смесь линий 75% C57BL/6 и 25% 129.

[00273] Для инфицирования культуру штамма Newman *S. aureus* выращивали в TSB в течение ночи, пересеивали и выращивали до середнелогарифмической фазы (OD600 = 1). Затем культуру дважды промывали с помощью PBS и ресуспендировали в PBS при $7,5 \times 10^8$ КОЕ/мл для инфицирования WT и нокаутированных мышей FcgRIIb/FcgRIII/FcgRIV или $4,35 \times 10^8$ КОЕ/мл для инфицирования мышей с C3^{-/-}, поскольку они более восприимчивы к инфекции. Мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкл бактериальной суспензии. Через один день после инфицирования мышей однократно обрабатывали указанным антителом, ресуспендированным в 100 мкл PBS, с конечной дозой 10 мг/кг, вводимой подкожно. Дополнительной группе мышей один раз в день вводили даптомицин в дозе 50 мг/кг, начиная с одного дня после инфицирования. За мышами наблюдали в отношении потери веса и состояния тела до 4 дней после инфицирования, после чего их

умерщвляли. Почки удаляли и ресуспендировали в 0,1% Triton X100 в PBS и гомогенизировали, используя пробирки для диссоциации C-max. Бактерии подсчитывали по колониеобразующим единицам путем серийного разведения и посева на чашках с TSA.

[00274] Результаты двух независимых экспериментов представлены в таблице 13 и таблице 14 (см. также фигуры 6 и 7 соответственно). Моноклональные антитела hIgG1^{*/*} к IsdB и к белку A снижали нагрузку на почки *S. aureus* на 3-4 log у мышей дикого типа, тогда как у мышей с дефицитом C3 среднее значение нагрузки на почки было аналогично контролю с hIgG1^{*/*} и необработанным группам, что демонстрирует, что C3 необходим для эффективности антител. Даптомицин, механизм действия которого не зависит от комплемента, в равной степени обладал защитным действием в отношении компетентности C3 и недостаточности фоновых параметров. Однако мыши с дефицитом по FcγRIIb/FcγRIII/FcγRIV все еще были защищены моноклональными антителами hIgG1^{*/*} к IsdB и к белку A, что демонстрирует, что эти FcγR не требовались для активности. Эти данные предполагают, что антитела hIgG1^{*/*} к белку A и к IsdB способствуют уничтожению стафилококков за счет механизма действия, требующего активности комплемента.

Таблица 13. Для эффективности моноклональных антител hIgG1^{*/*} к IsdB и к белку A требуется компонент C3 системы комплемента

Антитело	Контрольные совместно содержащиеся однопометники C3 ^{+/+}		Нокаутированные C3 ^{-/-}	
	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение
контроль с PBS	4,7E+07	5,3E+07	4,2E+07	4,9E+07
Контроль с hIgG1 ^{*/*} (REGN4440)	3,8E+07	3,9E+07	7,5E+07	9,2E+07
hIgG1 ^{*/*} к IsdB	1,9E+04	2,7E+04	3,5E+07	5,8E+07

(H1xH20295P2)				
hIgG1*/* к белку А (H1xH15140P)	1,4E+04	5,8E+04	1,4E+07	4,1E+07
Даптомицин	2,8E+04	1,1E+05	1,3E+04	4,8E+04

Таблица 14. Для эффективности моноклональных антител hIgG1*/* к IsdB и к белку А не требуются FcγRIIb/FcγRIII/FcγRIV с низкой степенью аффинности

	Мыши дикого типа VG (75% C57BL/6, 25% 129)		FcγRIIb/FcγRIII/FcγRIV КО	
Антитело	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение
контроль с PBS	5,0E+07	1,9E+08	3,8E+07	8,6E+07
Контроль с hIgG1*/*(REGN4440)	1,0E+07	4,2E+06	1,4E+07	4,4E+07
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2)	5,1E+03	2,8E+04	3,5E+04	3,2E+05
hIgG1*/* к белку А (H1xH15140P)	1,3E+05	3,1E+05	2,8E+04	2,6E+04

Пример 10. Тестирование антител в формате hIgG1 и hIgG1*/*к белку А и в модели пиодермии, вызванной *S. pseudintermedius*, у собак

[00275] Лабораторных биглей прививают метициллин-чувствительным штаммом *S. Pseudintermedius*. На, предварительно подстриженный участок кожи собаки с удаленной лентой шестью местно наносят один мл приблизительно 10^7 , 10^8 , 10^9 КОЕ на мл, а затем обрабатывают дермароллером (размер микроиглы 500 мкм)

непосредственно после нанесения. Собакам вводят hIgG1^{*/*} к белку A, hIgG1 к белку A или изотипический контроль (контроль с hIgG1^{*/*} REGN4440 L2) и наблюдают за ними ежедневно. Предполагаемые пустулы культивируют с целью выявления *S. pseudintermedius* и оценивают с помощью цитологических и гистопатологических способов. Каждые 24 часа производят оценку папул и пустул на всех трех участках бактериального посева. Отбирают цитологические образцы всех кожных поражений для выявления нейтрофилов с внутриклеточными кокками. Любой субкорнеальный нейтрофильный пустулезный дерматит с кокками и акантолитическими кератиноцитами в очаге поражения, соответствующий поверхностной пиодермии, будет отслеживаться с помощью гистопатологии. Получают изоляты пустул от всех собак для определения того, происходит ли инфекция от инокулирующего штамма *Staphylococcus pseudintermedius*, и определения эффективности лечения антителами. Результаты воспроизводят у всех собак после периода вымывания в течение нескольких недель. См. Bäumer et al., Establishing a canine superficial pyoderma model, Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(2): 331-337.

Пример 11. Получение дополнительных антител к белку A

[00276] Дополнительные антитела к белку A получали, как описано выше в примере 1. Константные области тяжелой цепи антитела представляют собой Fc-области IgG1 человека, содержащие аминокислотные замены H в положении 435 на R, согласно EU (H435R), или замену Y в положении 436 на F, согласно EU (Y436F), или замену H435R и Y436F. Мутации ^{*/*} вводили в векторы экспрессии, используемые для создания полностью человеческих антител к белку A, представленных в таблице 15.

[00277] В таблице 15 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных антител, представленных в настоящем документе. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в таблице 16. В таблице 17 представлены идентификаторы полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепи для двух антител к белку A.

Таблица 15. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1xH15135P* /*	60	62	64	66	68	70	72	74
H1xH15120P* /*	80	82	84	86	88	90	72	93

Таблица 16. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1xH15135P* /*	59	61	63	65	67	69	71	73
H1xH15120P* /*	79	81	83	85	87	89	91	92

**Таблица 17. Идентификаторы последовательностей для
последовательностей полноразмерной тяжелой и легкой цепи для мутированных
форм H1xH15120P и H1xH15135P (*/*)**

	SEQ ID NO:			
Обозначение антитела	Полноразмерная тяжелая цепь		Полноразмерная легкая цепь	
	Нуклеиновая кислота	Аминокислота	Нуклеиновая кислота	Аминокислота
H1xH15135P*/*	75	76	77	78
H1xH15120P*/*	94	95	96	97

Пример 12. Кинетика связывания Viacore антител к белку A,

связывающихся с белком А, измеренная при 25°C и 37°C

[00278] Константы равновесной диссоциации (K_D) для реагентов белка А, связывающихся с очищенными моноклональными антителами к белку А определяли с применением биосенсора Biacore T200 на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания проводили в подвижном буфере, состоящем из 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3,4 мМ EDTA и 0,05% об./об. Tween-20, pH 7,4 (HBS-EP) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали путем связывания амина с Fc-фрагментом специфического поликлонального антитела F(ab')₂ к иммуноглобулину человека- (Jackson № по кат: 109-006-008) для захвата моноклонального антитела к белку А. Исследования связывания выполняли с применением разных концентраций белка А (Calbiochem, 539202-5MG; 100 нМ–0,39 нМ; 4-кратное серийное разведение), полученных в подвижном буфере HBS-EP. Белки вводили на поверхность захваченного моноклонального антитела к белку А в течение 3,5 минут при скорости потока, составляющей 50 мкл/минута, при этом диссоциацию реагентов белка А, связанного с моноклональными антителами, контролировали в течение 10 минут в подвижном буфере HBS-EP. Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в режиме реального времени по модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с применением программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0c. Равновесную константу диссоциации связывания (K_D) и значения периодов полудиссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из кинетических скоростей следующим образом:

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

[00279] Кинетические параметры связывания для связывания белка А с моноклональными антителами к белку А*/*, представленными в данном документе, при 25°C и 37°C показаны в таблицах 18 и 19. При 25°C моноклональные антитела к белку А*/* связываются с белком А со значением K_D , находящемся в диапазоне значений 18–444 пМ, как показано в таблице 18. При 37°C моноклональные антитела к белку А*/* связываются с белком А со значением K_D , находящемся в диапазоне значений 14,1–330 пМ, как показано в таблице 19.

Таблица 18. Кинетические параметры связывания для связывания белка А с моноклональным антителом к белку А*/* при 25°C.

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 100 нМ Ag (RU)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H1xH15120P*/*	146 ± 2,8	69	1,25E+06	2,24E-05	1,80E-11	514,7
H1xH15135P*/*	127 ± 0,4	53	1,06E+06	4,71E-04	4,44E-10	24,5

Таблица 19. Кинетические параметры связывания для связывания белка А с моноклональным антителом к белку А*/* при 37°C.

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 100 нМ Ag (RU)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H1xH15120P*/*	88 ± 4	40	1,84E+06	2,61E-05	1,41E-11	443,2
H1xH15135P*/*	50 ± 0,8	29	1,76E+06	5,82E-04	3,30E-10	19,8

Пример 13. Проведение ELISA *S. aureus* для оценки специфичности связывания антитела в присутствии белка А

[00280] *S. aureus* экспрессирует белок, связывающийся с IgG, называемый белком А, на поверхности патогена. Белок А содержит 4-5 повторов домена, связывающегося с IgG, который характеризуется высокой аффинностью к Fc-части человеческих антител IgG1, IgG2 и IgG4. См. Loghem et al., 1982, staphylococcal Protein A and Human IgG subclasses and Allotypes, Scand. J. Immunol. 15: 275-278. Человеческие антитела IgG3 содержат аминокислотные замены, что приводит к

значительному снижению связывания белка А (H435R, Y436F, которые обозначаются */*). Моноклональные антитела hIgG1*/* к белку А должны обладать как специфичностью к белку А за счет CDR, так и избегать неспецифического связывания Fc, управляемого связыванием посредством модификации Fc.

[00281] Антитела hIgG1*/* к белку А оценивали в отношении связывания со штаммом Newman *S. aureus* дикого типа для определения характеристики специфичности связывания с антителом в присутствии белка А. Культуру *S. aureus* выращивали в течение ночи в TSB, промывали дважды с помощью PBS, а затем ресуспендировали при OD=0,5 ($1,25 \times 10^8$ КОЕ/мл). Планшеты для микротитрования Black Nunc покрывали 100 мкл/лунка суспензии *S. aureus* и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующее утро планшеты трижды промывали с помощью разбавляющего буфера для анализа (ADB, 1% BSA в PBS) и блокировали в течение двух часов с помощью 200 мкл блокирующего буфера (3% BSA + 0,5% Tween 20 в PBS) при комнатной температуре. Затем планшеты трижды промывали с помощью ADB, а затем инкубировали с первичным антителом в указанной концентрации при комнатной температуре в течение одного часа. Вторичное антитело (козье антитело к иммуноглобулину человека, конъюгированное с HRP; Thermofisher) добавляли при разведении 1:4000 и инкубировали в течение одного часа, после чего планшеты трижды промывали с помощью ADB. Субстрат Pico добавляли на десять минут и планшеты считывали с помощью ридера (Victor 3) для измерения люминесцентного сигнала.

[00282] Три антитела hIgG1*/* к белку А связываются со штаммом Newman *S. aureus* дикого типа с более низкими показателями EC₅₀, измеренными в нМ, в то время как изотипический контроль с антителом hIgG1*/* (к CD28) характеризовался наименьшим связыванием. См. таблицу 20. Эти данные показывают, что антитела hIgG1*/* к белку А связываются в первую очередь посредством CDR антитела и что неспецифическое Fc-зависимое связывание устраняется посредством модификации hIgG1 остатками */*.

Таблица 20. Результаты ELISA в отношении связывания *S. aureus* с антителами в формате hIgG1*/* к белку А

Антитело	Результаты проведения ELISA для определения EC_{50} в $\log[M]$
	Штамм Newman WT <i>S. Aureus</i>
H1xH15120P*/*	2,797E-10
H1xH15135P*/*	2,154E-10
H1xH15140P*/*	9,059E-11
Изотипический контроль(H1xH14186P2*/*)	Связывание отсутствует

Пример 14. Проведение ELISA для оценки специфичности связывания антител с *S. aureus*, *S. intermedius* и *S. pseudintermedius*

[00283] Пидермия представляет собой инфекцию собак, вызванную *Staphylococcus intermedius* и *pseudintermedius*. Как и *S. aureus*, такие штаммы экспрессируют 1-2 IgG-связывающих белка, которые являются гомологами белка А, называемыми SpsQ и SpsP (См. Balachandran, et al., 2018, Expression and Function of Protein A in *Staphylococcus pseudintermedius*. Virulence, 9(1): 390-401; Abouelkhair, et al., 2018, Characterization of Recombinant Wild-type and Nontoxigenic Protein A from *Staphylococcus pseudintermedius*. Virulence, 9(1): 1050-1061). По причине родства последовательностей антитела оценивали в отношении связывания со штаммами *S. intermedius* и *S. pseudintermedius*.

[00284] Антитела hIgG1*/* к белку А по настоящему изобретению оценивали в отношении связывания со штаммами Newman *S. aureus*, 27369 *Staphylococcus intermedius*, MRSP 88493 *Staphylococcus pseudintermedius* (метициллинрезистентный) и AHDRCC 98200 *Staphylococcus pseudintermedius*. Культуры *S. aureus* выращивали в течение ночи в RPMI, промывали дважды с помощью PBS, а затем ресуспендировали при OD=0,5 ($1,25 \times 10^8$ КОЕ/мл). Планшеты

для микротитрования Black Nunc покрывали 100 мкл/лунка суспензии со стафилококком и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующее утро планшеты трижды промывали с помощью промывочного буфера (1% tween20 + PBS) и блокировали в течение двух часов с помощью 200 мкл блокирующего буфера (3% BSA + 0,5% Tween 20 в PBS) при комнатной температуре. Затем планшеты трижды промывали с помощью промывочного буфера, а затем инкубировали с первичным антителом в указанной концентрации при комнатной температуре в течение одного часа. Вторичное антитело (куриное антитело к иммуноглобулину человека, конъюгированное с HRP) добавляли при разведении 1:4000 и инкубировали в течение одного часа, после чего планшеты трижды промывали с помощью промывочного буфера. Субстрат Pico добавляли на 10 минут и планшеты считывали с помощью планшет-ридера (Spectromax) для измерения люминесцентного сигнала.

[00285] Как показано в таблице 21, штаммы *Staphylococcus aureus*, *intermedius*, и *pseudintermedius*, выращенные в RPMI, связываются с изотипическим контролем в формате hIgG1, но только на низком уровне с тем же изотипическим контролем в формате hIgG1*/*, что указывает на экспрессию связывающего белка IgG1 со специфичностью, подобно белку A на поверхности бактерии. Два моноклональных антитела hIgG1*/* к белку A, H1xH15120P и H1xH15135P, связываются с тестируемыми штаммами *Staphylococcus aureus*, *intermedius* и *pseudintermedius*, в то время как H1xH15140P связывается только со штаммом Newman *S. aureus* с фоновым сигналом.

Таблица 21. Результаты ELISA в отношении связывания стафилококка с антителом в формате hIgG1*/* к белку A

				изотипи	изотип
				ческий	ически
Антите ло [M]	H1xH151	H1xH151	H1xH151	контрол	й
	20P	35P	40P	ь	контро
	hIgG1*/*	hIgG1*/*	hIgG1*/*	REGN4	ль
				440	REGN1
				hIgG1*/	932

					*	hIgG1
ШТАММ 27369 <i>S. Intermedius</i>	3,09E-07	1,02E+05	5,09E+05	2,10E+04	1,11E+04	1,23E+05
	3,86E-08	8,64E+04	1,40E+05	8,31E+03	3,85E+03	3,48E+04
	4,82E-09	5,04E+04	2,43E+04	3,03E+03	2,49E+03	4,21E+04
	6,03E-10	2,82E+04	7,12E+03	3,34E+03	3,01E+03	5,30E+03
	7,54E-11	1,10E+04	3,38E+03	2,66E+03	2,51E+03	2,68E+03
	9,42E-12	3,46E+03	1,38E+03	1,52E+03	7,75E+02	1,61E+03
	1,18E-12	2,73E+03	2,58E+03	2,46E+03	2,21E+03	9,74E+03
ШТАММ 98200S. <i>pseudintermedius</i>	1,47E-13	1,04E+03	1,16E+03	1,51E+03	8,96E+02	2,53E+04
	3,09E-07	1,58E+05	7,15E+05	2,06E+04	1,52E+04	1,32E+05
	3,86E-08	1,48E+05	2,37E+05	6,68E+03	5,10E+03	3,64E+04
	4,82E-09	8,36E+04	3,90E+04	3,40E+03	2,41E+03	8,04E+03
	6,03E-10	3,92E+04	9,35E+03	4,89E+03	2,76E+03	4,77E+03
	7,54E-11	1,18E+04	7,63E+03	4,68E+03	2,24E+03	2,59E+03
	9,42E-12	4,24E+03	1,32E+04	2,48E+03	1,17E+03	1,46E+03

	1,18E-12	3,35E+03	5,96E+03	5,02E+03	2,17E+03	2,83E+03
	1,47E-13	2,97E+03	6,22E+03	3,94E+03	1,12E+03	1,48E+03
	3,09E-07	2,61E+04	4,84E+05	1,07E+04	1,47E+04	4,39E+04
	3,86E-08	1,33E+04	9,50E+04	6,36E+03	6,47E+03	1,45E+04
	4,82E-09	7,97E+03	1,72E+04	5,97E+03	7,36E+03	8,95E+03
III _{TaMM} 88493	6,03E-10	7,51E+03	8,80E+03	1,00E+04	7,08E+03	1,10E+04
<i>S. pseudintermedius</i>	7,54E-11	8,92E+03	6,40E+03	5,41E+03	6,37E+03	7,56E+03
	9,42E-12	3,88E+03	3,64E+03	4,27E+03	6,15E+03	7,98E+03
	1,18E-12	5,43E+03	5,91E+03	5,99E+03	6,71E+03	8,92E+03
	1,47E-13	4,35E+03	3,86E+03	3,47E+03	1,23E+03	8,19E+03
	3,09E-07	9,17E+05	1,15E+06	9,79E+05	3,88E+04	5,06E+05
	3,86E-08	8,15E+05	1,07E+06	8,38E+05	2,76E+04	4,34E+05
III _{TaMM} Newman _{S.}	4,82E-09	8,20E+05	1,02E+06	8,28E+05	1,94E+04	6,52E+05
<i>Aureus</i>	6,03E-10	7,43E+05	6,89E+05	6,47E+05	2,75E+04	5,09E+05
	7,54E-11	4,47E+05	2,41E+05	2,38E+05	2,44E+04	2,53E+05
	9,42E-12	1,18E+05	5,02E+04	6,05E+04	1,67E+04	7,25E+04

12				4	04
1,18E-				1,71E+0	3,02E+
12	1,71E+05	4,23E+04	2,84E+04	4	04
1,47E-				1,55E+0	1,86E+
13	2,72E+04	2,28E+04	2,20E+04	4	04

Пример 15. Блокирование связывания с помощью hIgG1*/* к белку А в отношении Fc с *S. aureus*, как показано с помощью проточной цитометрии

[00286] Три иллюстративных антитела hIgG1*/* к белку А оценивали в отношении способности блокировать взаимодействия между флуоресцентно меченым Fc-фрагментом и *S. aureus* дикого типа, экспрессирующим белок А. Штаммы *S. aureus* дикого типа и штаммы, дефицитные по белку А (Δspa), выращивали в течение ночи в TSB, промывали дважды с помощью PBS и разбавляли до конечной концентрации, составляющей 1×10^7 КОЕ/мл в PBS. Затем бактерии фиксировали 2% параформальдегидом в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего их трижды промывали PBS, ресуспендировали в блокирующем буфере (3% BSA в PBS) и инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов. После блокирования бактерии промывали один раз и ресуспендировали в 200 мкл указанного блокирующего антитела в концентрации либо 10 мкг/мл, либо 1 мкг/мл в 1% BSA в PBS и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Затем бактерии трижды промывали с помощью PBS и ресуспендировали в 1% BSA в PBS с меченым с помощью Alexa-488 фрагментом Fc в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Наконец, бактерии промывали три раза с помощью PBS и ресуспендировали в PBS до конечного объема, составляющего 200 мкл, и флуоресцентные сигналы измеряли с помощью проточной цитометрии (Guava Millipore Easycyte).

[00287] Меченый с помощью alexa-488 Fc-фрагмент IgG1 связывал *S. aureus* дикого типа, экспрессирующий белок А (геометрическое среднее значение флуоресцентного сигнала = 1850), но только на минимальном уровне со штаммом, дефицитным по белку А (Δspa , геометрическое среднее значение флуоресцентного

сигнала = 12), что свидетельствует о потребности в белке. А для связывания Fc с бактерией. Такие контроли применяли для нормализации измерений связывания Fc с *S. aureus* дикого типа, предварительно обработанными антителами к белку А при 10 мкг/мл и 1 мкг/мл. Как показано в таблице 22, H1xH15120P блокировало >90% связывания Fc с *S. aureus* при обеих концентрациях, H1xH15140P блокировало >75% связывания с Fc при обеих концентрациях, а H1xH15135P блокировало >60% связывания Fc с *S. aureus* при обеих концентрациях. Такие данные демонстрируют, что антитела hIgG1*/* к белку А могут блокировать связывание Fc с *S. aureus*.

Таблица 22. Блокирование связывания с помощью hIgG1*/* к белку А в отношении Fc с *S. aureus*

Антитело	Блокирующая активность Fc: <i>S. aureus</i> (%)	
	10 мкг/мл	1 мкг/мл
<i>S. aureus</i> дикого типа (контроль без антител)	0	0
Δ spa <i>S. aureus</i> (контроль без антител)	100	100
Изотипический контроль(H1xH14186P2*/*)	-13	-5
H1xH15120P*/*-L1	99	90
H1xH15135P*/*-L1	66	62
H1xH15140P*/*-L1	97	78

Пример 16. Блокирование управляемого VH3 связывания антитела с помощью hIgG1*/* к белку А с *S. aureus*

[00288] В дополнение к связыванию с Fc, белок А обладает способностью связываться с Fab-областью антител IgG, IgM, IgA и IgE посредством области, которую иногда называют «альтернативным сайтом связывания». См. Inganas, 1981, Comparison of mechanisms of interaction between protein A from *Staphylococcus aureus* and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical FC gamma and the

alternative F(ab')₂ epsilon protein A interactions. Scand J Immunol, 13(4): 343-52.

Впоследствии было обнаружено, что активность связывания Fab ограничена антителами, содержащими вариабельные области тяжелой цепи семейства VH3. См. Sasso, et al., 1989, Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. J Immunol, 142(8): 2778-83. За счет связывания с антителами семейства VH3 *S. aureus* может образовывать кластеры поверхностных рецепторов на иммунных клетках с потенциально вредными последствиями, например, кластеризацией рецепторов В-клеток, приводящей к неспецифической активации В-клеток, или кластеризацией IgE, вызывающей активацию базофилов. См. Silverman, 1992, Human antibody responses to bacterial antigens: studies of a model conventional antigen and a proposed model B cell superantigen, Int Rev Immunol, 9(1): 57-78; Marone, et al., 1987, Mechanism of activation of human basophils by *Staphylococcus aureus* Cowan 1. Infect Immun, 55(3): 803-9. Моноклональные антитела со специфичностью в отношении белка А могут обладать потенциалом блокирования взаимодействия между Fab антител VH3 и *S. aureus*, экспрессирующим белок А, и предотвращать неспецифическую активацию иммунных клеток.

[00289] Три антитела hIgG1^{*/*} к белку А оценивали в отношении способности блокировать взаимодействия между флуоресцентно меченным антителом линии VH3 и *S. aureus* дикого типа, экспрессирующим белок А. Меченое антитело линии VH3 (hIgG1^{*/*} Fc^{**}-488 к PD1) содержало ^{*/*} остатки (H435R, Y436F), так что связывание с белком А, управляемое Fc, устранялось, и оставалось только связывание, управляемое VH3. Штамм *S. aureus* дикого типа и штамм, дефицитный по белку А, (Δspa) выращивали в течение ночи в TSB, промывали дважды с помощью PBS, и разбавляли до конечной концентрации, составляющей 1×10^7 КОЕ/мл, в PBS. Затем бактерии фиксировали 2% параформальдегидом в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего их трижды промывали PBS, ресуспендировали в блокирующем буфере (3% BSA в PBS) и инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов. После блокирования бактерии промывали один раз с помощью PBS и ресуспендировали в 200 мкл указанного блокирующего антитела в концентрации либо 10 мкг/мл, либо 1 мкг/мл в 1% BSA в PBS и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Затем бактерии трижды

промывали с помощью PBS и ресуспендировали в меченом с помощью Alexa-488 антителе hIgG1*/* линии VH3 в концентрации 5 мкг/мл в 1% BSA в PBS и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Наконец, бактерий промывали три раза с помощью PBS и ресуспендировали в PBS до конечного объема, составляющего 200 мкл, и флуоресцентные сигналы измеряли с помощью проточной цитометрии (Guava Millipore Easycyte).

[00290] Меченое с помощью Alexa-488 антитело hIgG1*/* VH3 связывалось с *S. aureus* дикого типа, экспрессирующем белок А (геометрическое среднее значение флуоресцентного сигнала = 273), но только на минимальном уровне со штаммом, дефицитным по белку А (Δspa , геометрическое среднее значение флуоресцентного сигнала = 10,5), что свидетельствует о потребности в белке А для связывания антитела VH3 с бактерией. Такие контроли применяли для нормализации измерения связывания антитела VH3 *S. aureus* дикого типа, предварительно обработанные антителами к белку А при 10 мкг/мл и 1 мкг/мл. Как показано в таблице 23, три антитела hIgG1*/* к белку А были способны блокировать >80% связывания антитела VH3 с *S. aureus* при обеих концентрациях антител к белку А. Эти данные демонстрируют, что антитела hIgG1*/* к белку А могут блокировать управляемое VH3 связывание с *S. aureus*, что предполагает, что они могут применяться для предотвращения вредного образования кластеров рецепторов иммунных клеток, такого как активность суперантигена В-клетки или дегрануляция базофила.

Таблица 23. Блокирование hIgG*/* к белку А управляемого VH3 связывания антитела с *S. aureus*

Антитело	Блокирующая активность антитело VH3: <i>S. aureus</i> (%)	
	10 мкг/мл	1 мкг/мл
<i>S. aureus</i> дикого типа (контроль без антител)	0	0
Δspa <i>S. aureus</i> (контроль без антител)	100	100

Изотипический контроль(H1xH14186P2*/*)	46,1	36,2
H1xH15120P*/*-L1	96,1	95,0
H1xH15135P*/*-L1	84,4	89,8
H1xH15140P*/*-L1	84,7	84,5

Пример 17. Выживаемость *S. aureus* в сыворотке крови с сохранившимся комплементом и индуцированное антителом уничтожение антителами hIgG*/*

[00291] Как отмечалось ранее, *S. intermedius* и *S. pseudintermedius*, которые являются возбудителями пиодермии у собак, экспрессируют 1-2 IgG-связывающих белка, которые являются гомологами белка A, и эти гомологи называются SpsQ и SpsP (см. Balachandran, M., D.A. Bemis, and S.A. Kania, *Expression and function of protein A in Staphylococcus pseudintermedius*. *Virulence*, 2018. 9(1): p. 390-401; Abouelkhair, M.A., D.A. Bemis и S.A. Kania, *Characterization of recombinant wild-type and nontoxigenic protein A from Staphylococcus pseudintermedius*. *Virulence*, 2018. 9(1): p. 1050-1061).

[00292] По причине родства последовательности между SpsQ, SpsP и белком A, антитело по настоящему изобретению (H1xH15120P), которое способно связывать штаммы *S. intermedius* и *S. pseudintermedius*, оценивали в отношении их способности индуцировать уничтожение в сыворотке крови. Индуцированное уничтожение в сыворотке крови сравнивали с таковым другого моноклонального антитела к белку A, H1xH15140P, у которого отсутствует связывание со штаммами *S. intermedius* и *S. pseudintermedius*, и применяли в качестве контроля в данном исследовании.

[00293] Более конкретно, антитела hIgG1*/* к белку A по настоящему изобретению оценивали в отношении их способности стимулировать уничтожение штаммов стафилококка Newman *S. aureus*, 27369 *S. Intermedius* и AHDRCC 98200S. *pseudintermedius* в нормальной сыворотке крови человека. Вкратце, культуру стафилококков выращивали в RPMI в течение ночи, промывали в PBS и ресуспендировали в RPMI + 0,05% BSA до концентрации, составляющей 1×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Нормальную сыворотку крови человека (NHS)

размораживали на водяной бане при 37°C, а затем хранили на льду. В трех повторностях 100 мкл суспензии *S. aureus* смешивали с тестируемыми антителами и 100 мкл нормальной сыворотки крови человека добавляли до конечной концентрации, составляющей 50% сыворотки и 10 мкг/мл, 30 мкг/мл, 90 мкг/мл или 270 мкг/мл моноклонального антитела. Тестируемые образцы затем инкубировали со встряхиванием (100 об./мин) при 37°C в течение 16 часов. После инкубации к образцам добавляли 100 мкл лизирующего буфера для агглютинации (PBS с добавлением 200 Ед стрептокиназы, 2 мкг/мл РНКазы, 10 мкг/мл ДНКазы, 0,5% сапонины на мл PBS) интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Выживаемость стафилококка вычисляли по колониеобразующим единицам посредством серийных разведений и посева на чашках с TSA.

[0001] Результаты репрезентативного эксперимента показаны в таблице 24.

Антитело изотипического контроля характеризовалось минимальным влиянием в отношении жизнеспособности штаммов *S. aureus*, *S. intermedius*, и *S. pseudintermedius* при наибольшей тестируемой концентрации (270 мкг/мл). Дозозависимое уничтожение штамма Newman *S. aureus* в сыворотке крови человека, индуцированное антителами H1xH15140P*/* и H1xH15120P*/*. H1xH15120P*/*, в отличие от H1xH15140P*/*, индуцировало более 90% уничтожения *S. intermedius* и *S. pseudintermedius* в сыворотке крови при наибольшей тестируемой концентрации (270 мкг/мл). Способность индуцировать уничтожение в сыворотке крови коррелирует с данными относительно связывания, полученными с помощью ELISA, где как H1xH15140P*/*, так и H1xH15120P*/* связывается со штаммом Newman *S. aureus*, в то время как H1xH15120P*/*, в отличие от H1xH15140P*/*, хорошо связывается с *S. intermedius* и *S. pseudintermedius*.

Таблица 24. Индуцированное антителами уничтожение штаммов Newman *S. aureus*, AHRCC 98200 *S. pseudintermedius* и 27369 *S. intermedius* в сыворотке крови человека при обработке моноклональным антителом к белку А*/*

		Штамм 27369 <i>S. intermedius</i>		Штамм AHRCC 98200 <i>S. pseudintermedius</i>		Штамм Newman <i>S. aureus</i>	
	[mAb] мкг/ мл	Медианное значение КОЕ/мл	Стандартное отклонение	Медианное значение КОЕ/мл	Стандартное отклонение	Медианное значение КОЕ/мл	Стандартное отклонение
Стафилококки + сыворотка крови	(-)	7,8E+06	5,0E+05	8,3E+06	1,8E+06	9,5E+06	1,3E+06
Изотипический контроль с hIgG1*/* REGN4440	270	8,0E+06	9,0E+05	7,5E+06	6,6E+05	7,0E+06	1,8E+06
H1xH15140 P*/*	10	6,0E+06	1,1E+06	7,3E+06	5,0E+05	4,3E+06	5,2E+05
	30	8,3E+06	8,8E+05	6,8E+06	1,2E+06	1,0E+06	9,0E+04
	90	8,5E+06	1,2E+06	6,8E+06	2,4E+06	6,0E+05	2,9E+04
	270	3,8E+06	2,0E+06	4,5E+06	1,3E+06	1,8E+05	2,9E+04
H1xH15120	10	9,0E+06	2,0E+06	5,8E+06	2,0E+06	9,0E+06	5,2E+05

P*/*	30	6,3E+06	1,2E+06	4,8E+06	1,9E+06	5,0E+06	1,0E+06
	90	5,3E+06	2,0E+06	2,3E+06	1,1E+06	3,5E+06	8,8E+05
	270	5,0E+05	1,3E+05	7,8E+05	5,0E+04	6,5E+05	1,8E+05

Пример 18. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой и легкой цепи антител к IsdA*/* и антител к IsdB*/*

[0002] В таблице 25 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных антител, представленных в данном документе. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в таблице 26. В таблице 27 представлены идентификаторы полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепи для одного антитела к IsdA и одного антитела к IsdB, оба из которых содержат мутации тяжелой цепи */*.

Таблица 25. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1xH20207P* /* (к IsdA)	99	101	103	105	107	109	111	113
H1xH20286P* /* (к IsdB)	119	121	123	125	127	129	131	133

Таблица 26. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1xH20207P* /*	98	100	102	104	106	108	110	112

(к IsdA)								
H1xH20286P*								
/*	118	120	122	124	126	128	130	132
(к IsdB)								

Таблица 27. Идентификаторы последовательности для полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепи для H1xH20207P (*/*) и H1xH20286P (*/*)

	SEQ ID NO:			
Обозначение антитела	Полноразмерная тяжелая цепь		Полноразмерная Легкая цепь	
	Нуклеиновая кислота	Аминокислота	Нуклеиновая кислота	Аминокислота
H1xH20207P*/* (к IsdA)	114	115	116	117
H1xH20286P*/* (к IsdB)	134	135	136	137

[0003] Антитела, представленные в данном документе, могут быть любого изотипа, если тяжелая цепь иммуноглобулина отличается от таковой немодифицированного родительского антитела к IgG *S. aureus* по меньшей мере двумя аминокислотными заменами: H435R и Y436F, по нумерации согласно индексу EU. Мутированная форма IgG1, имеющая две аминокислотные замены H435R и Y436F, в настоящем изобретении обозначается как */*. Антитела к IsdA*/* и к IsdB*/*, представленные в данном документе могут содержать последовательности переменного домена и CDR, как указано в таблицах 25 и 26, и человеческий Fc-домен изотипа IgG1, имеющий мутации H435R и Y436F, в соответствии с SEQ ID NO: 58. Для определенных путей применения или экспериментов домен Fc может представлять собой домен Fc мыши. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что, антитело, с Fc конкретного изотипа можно преобразовать в антитело с Fc другого изотипа, имеющим эквивалентные мутации

H435R и Y436F (*например*, антитело с Fc мышиного IgG3 можно преобразовать в антитело с человеческим IgG1*/* и т. д. IgG1*/* и т. д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), обозначенные числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 25 и 26, останутся такими же, и при этом ожидается, что связывающие свойства будут идентичными или по сути сходными независимо от природы домена Fc, поскольку присутствуют мутации H435R и Y436F.

Пример 19. Выживаемость *S. aureus* в сыворотке крови с сохраненным комплементом и индуцированное антителами уничтожение моноклональными антителами hIgG1*/*

[0004] Подобно примерам 5 и 7, антитела в данном эксперименте тестировали в отношении их способности преодолевать избегание комплемента *S. aureus* и инициировать индуцированное антителами уничтожение в сыворотке крови MSSA штамма Newman *S. aureus*.

[0005] Антитела hIgG1*/* к белку A, IsdA и IsdB оценивали в отношении их способности стимулировать уничтожение штамма Newman *S. aureus* в нормальной сыворотке крови человека. Вкратце, культуру штамма Newman *S. aureus* выращивали в RPMI в течение ночи, промывали в PBS, и ресуспендировали в RPMI + 0,05% BSA до концентрации, составляющей 1×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Комплемент из нормальной сыворотки крови человека (NHS) размораживали на водяной бане при 37°C, а затем хранили на льду. В трех повторностях 100 мкл суспензии *S. aureus* смешивали с тестируемыми антителами и 100 мкл указанной сыворотки добавляли до конечной концентрации 50% сыворотки крови и 200 мкг/мл моноклонального антитела. Тестируемые образцы затем инкубировали со встряхиванием (100 об./мин) при 37°C в течение 16 ч. После инкубации к образцам добавляли 100 мкл лизирующего буфера для агглютинации (PBS с добавлением 200 Ед стрептокиназы и 0,5% сапонины на мл PBS) интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Выживаемость *S. aureus* вычисляли по колониеобразующим единицам посредством серийных разведений и посева на чашках с TSA.

[0006] Результаты репрезентативного эксперимента показаны в таблице 28 и на фигуре 8. Контроль с hIgG1*/* и моноклональные антитела в формате hIgG1 к IsdB не влияли на выживаемость штаммов *S. aureus* в NHS. Однако, моноклональные антитела hIgG1*/* к IsdB H1xH20295P2 и H1xH20286P, моноклональное антитело hIgG1*/* к IsdA H1xH20207P и моноклональное антитело hIgG1*/* к белку A H1xH15140P характеризовались бактерицидной активностью в сыворотке крови в течение более 16 часов со снижением жизнеспособности *S. aureus*, составляющим ~1-2 log.

Таблица 28. Выживаемость MSSA штамма Newman *S. aureus* в сыворотке крови человека с обработкой */* антителом к IsdB, к IsdA и к белку A

Антитело (200 мкг/мл) 16-часовая инкубация	Штамм Newman <i>S. aureus</i>	
	медианное значение КОЕ/мл	стандартное отклонение
<i>S. aureus</i> + сыворотка крови	8,50E+06	9,46E+05
Контроль с hIgG1*/*(REGN4440)	9,75E+06	8,78E+05
hIgG1 к IsdB (H1H20295P2)	7,25E+06	6,29E+05
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20295P2)	4,50E+05	1,01E+05
hIgG1*/* к IsdB (H1xH20286P)	8,25E+04	2,50E+04
hIgG1*/* к IsdA (H1xH20207P)	5,25E+04	9,01E+03
hIgG1*/* к белку A (H1xH15140P)	1,25E+05	1,46E+05

Пример 20. Тестирование антител в формате hIgG1 и hIgG1*/* к IsdB и к белку A в модели диссеминированной инфекции *S. aureus*

[0007] Используя ту же модель диссеминированной инфекции *S. aureus*, упомянутую в примере 6, были протестированы антитела в формате hIgG1*/* к IsdB,

к IsdA и к белку A в отношении их способности снижать нагрузку на почки при введении через 1 день после инфицирования штаммом Newman *S. aureus*.

[0008] Вкратце, культуру штамма Newman *S. aureus* выращивали в TSB в течение ночи, пересекали и выращивали до среднелогарифмической фазы ($OD_{600}=1$). Культуру затем промывали в PBS дважды и ресуспендировали в PBS при оптической плотности, составляющей $3 (7,5 \times 10^8 \text{ КОЕ/мл})$. Мышам C57BL/6 внутрибрюшинно вводили 200 мкл бактериальной суспензии. Через один день после инфицирования, мышей обрабатывали 10 мг/кг указанного моноклонального антитела в PBS при введении 100 мкл подкожно. За мышами наблюдали в отношении потери веса и состояния тела до 4 дней после инфицирования, после чего их умерщвляли. Почки удаляли и ресуспендировали в 0,1% Triton X100 в PBS и гомогенизировали, используя пробирки для диссоциации C-mach. Бактерии подсчитывали по колониеобразующим единицам путем серийного разведения и посева на чашках с TSA.

[0009] Результаты представлены в таблице 29 и на фигуре 9. Моноклональные антитела в формате hIgG1*/* H1xH20295P2, H1xH20286P, H1xH20207P и H1xH15140P снижали нагрузку на почки *S. aureus* на 3-5 log по сравнению с необработанными мышами при введении в дозе, составляющей 10 мг/кг через день после инфицирования. У контрольной группы с обработкой hIgG1*/* нагрузка на почки была аналогична таковой для необработанных мышей.

Таблица 29. Нагрузка на почки *S. aureus* у мышей, обработанных антителами

	медианное значение КОЕ/пара почек	стандартное отклонение
Инфицированный контроль (PBS)	1,8E+08	3,6E+07
Контроль с hIgG1*/*(REGN4440)	1,6E+08	1,1E+08

hIgG1*/* к IsdB H1xH20295P2	2,9E+04	1,8E+04
hIgG1*/* к IsdB H1xH20286P	3,5E+03	1,6E+04
hIgG1*/* к IsdA H1xH20207P	1,8E+04	1,5E+04
hIgG1*/* к белку A H1xH15140P	4,4E+04	1,4E+05

Пример 21. Функциональный анализ выживаемости бактерий в цельной крови при тестировании антител hIgG1*/* к IsdA, к IsdB и к белку A

[0010] Выживаемость *S. aureus* в цельной крови человека оценивали в анализе *ex vivo* для изучения роли комплемента и иммунных эффекторных клеток для индуцирования уничтожения *S. aureus*. См. Thammavongsa et al., *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. J Exp Med. 2009 Oct 26; 206(11): 2417-27. Активность противостафилококковых моноклональных антител в формате hIgG1*/*, антител к IsdB, к IsdA и к белку A, для стимулирования индуцированного антителами уничтожения штамма Newman *S. aureus* в цельной крови оценивали через четыре часа после инфекции.

[0011] Свежую кровь получали от пяти независимых доноров с применением цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Кроме того, перед экспериментом добавляли дополнительные 500 нМ дабигатрана для предотвращения образования сгустков. Культуру Newman *S. aureus* выращивали в RPMI, не содержащем фенола, в течение ночи, промывали в PBS и ресуспендировали до концентрации, составляющей 1×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл в PBS. 100 мкл мастер-микса бактерий и антитела получали путем разбавления антитела в бактериальной суспензии до 1 мг/мл. В трех повторностях 10 мкл мастер-микса добавляли к 100 мкл цельной крови человека до конечной концентрации, составляющей 100 мкг/мл антитела и 1×10^4 КОЕ. Образцы инкубировали в микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл при 37°C со встряхиванием (600 об./мин) в течение 4 часов. После инкубации к образцам добавляли 100 мкл лизирующего буфера для агглютинации (PBS с добавлением 200

Ед стрептокиназы и 5% сапони́на в PBS), интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°C, и встряхивали в течение 5 минут. Выживаемость *S. aureus* вычисляли по колониеобразующим единицам посредством серийных разведений и посева на чашках с TSA.

[0012] Эксперименты проводили с кровью от пяти независимых доноров. Для каждого донора группы обработки нормализовали по отношению к необработанному контролю и выражали в виде процента выживаемости *S. aureus*. Отдельные точки данных представляют собой медианное значение выживаемости *S. aureus* от одного донора.

[0013] Результаты, полученные для пяти независимых доноров крови, показаны на фигуре 10. Моноклональное антитело изотипического контроля hIgG1*/* не влияло на жизнеспособность *S. aureus*, однако моноклональные антитела hIgG1*/* к белку A, к IsdA и к IsdB индуцировали антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека.

[0014] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, кроме описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с антигеном *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), при этом антитело обладает одной или более из следующих характеристик

(a) характеризуется ослабленным связыванием Fc с белком A и/или SpsQ;

(b) содержит мутации H435R и Y436F в Fc hIgG1 (нумерация согласно индексу EU) и

(c) содержит тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело или антитело, оптимизированное для применения у собак.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антитело содержит вариабельный домен, который специфически связывается с антигеном *S. aureus*, выбранным из группы, состоящей из IsdA, IsdB, IsdC, IsdE, IsdH, белка A, ClfA, ClfB, CP5, CP8, SdrC, SdrD, SdrE, FnBpA, FnBpB, Cna, полисахарида поли-N-ацетилглюкозамина (PNAG) и SasG.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело специфически связывается с белком A *S. aureus* и обладает одной или более из следующих характеристик

(a) демонстрирует константу диссоциации (K_D), составляющую менее 10^{-9} , как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связывается со штаммом Newman WT *S. aureus* со значением EC_{50} , составляющим менее 10^{-9} ;

- (c) демонстрирует комплементзависимое уничтожение *S. aureus*;
- (d) перекрестно реагирует с *S. aureus*, *S. intermedius* и/или *S. pseudintermedius*;
- (e) облегчает взаимодействия между Fab антител VH3 и *S. aureus*, экспрессирующим белок A;
- (f) снижает нагрузку на почки *S. aureus* на 3-5 log по сравнению с необработанными мышами в модели диссеминированной инфекции;
- (g) демонстрирует антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека;
- (h) содержит три определяющих комплементарность участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 60 и 80; и
- (i) содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 68 и 88.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело специфически связывается с IsdA *S. aureus* и обладает одной или более из следующих характеристик

- (a) демонстрирует константу диссоциации (K_D), составляющую менее 10^{-8} , как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- (b) снижает нагрузку на почки *S. aureus* на 3-5 log по сравнению с необработанными мышами в модели диссеминированной инфекции;
- (c) демонстрирует антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека;
- (d) содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 99; и
- (e) содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 107.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело специфически связывается с IsdB *S. aureus* и обладает одной или более из следующих характеристик

(a) связывается со штаммом Newman WT *S. aureus* со значением EC_{50} , составляющим менее 10^{-10} ;

(b) снижает нагрузку на почки *S. aureus* у обработанных мышей в приблизительно 1000 раз;

(c) демонстрирует комплементзависимое уничтожение *S. aureus*;

(d) демонстрирует антителозависимое уничтожение *S. aureus* в крови человека;

(e) содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34 и 119;

(f) содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42 и 127;

(g) содержит последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 54 и

(h) содержит последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 52.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком A *S. aureus*, содержащие

(a) три определяющих комплементарность участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 60 и 80; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 68 и 88, и

(b) тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащие комбинацию аминокислотных последовательностей

HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20/22/24/28/30/32, 62/64/66/70/72/74 и 82/84/86/90/72/93.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7 или п. 8, где антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 60/68 и 80/88.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с IsdA *S. aureus*, содержащие

(a) три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 99; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 107, и

(b) тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, содержащие комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16 и 101/103/105/109/111/113.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10 или п. 11, где антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 и 99/107.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с IsdB *S. aureus*, содержащие

(a) три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34 и 119; и три CDR легкой цепи

(LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42 и 127, и

(b) тяжелую цепь hIgG1 под SEQ ID NO: 58.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, содержащие комбинацию аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48 и 121/123/125/129/131/133.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13 или п. 14, где антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34/42 и 119/127.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 13—15, где антитело содержит тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54 и 135.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 13—16, где антитело содержит легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52 и 137.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1—17 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

19. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—17.

20. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п. 19.

21. Клетка, экспрессирующая вектор по п. 20.

22. Способ предупреждения, лечения или уменьшения тяжести инфекции, вызванной *S. aureus*, состояния, обусловленного инфекцией, вызванной *S. aureus*, или по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *S. aureus*, или уменьшения частоты возникновения или тяжести инфекции, вызванной *S. aureus*, состояния, обусловленного инфекцией, вызванной *S. aureus*, по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *S. aureus*, при этом способ включает введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1—17 или фармацевтической композиции по п. 18 субъекту, нуждающемуся в этом.

23. Способ по п. 22, где инфекция, вызванная *S. aureus*, является острой или хронической.

24. Способ по п. 22 или п. 23, где состояние, обусловленное инфекцией, вызванной *S. aureus*, представляет собой целлюлит, бактериемию, некроз кожи, инфекцию век, инфекцию глаз, неонатальный конъюнктивит, остеомиелит, импетиго, фурункулы, синдром ошпаренной кожи, отравление пищевыми продуктами, пневмонию, послеоперационную инфекцию, ожоговую инфекцию, инфекцию мочевыводящих путей, менингит, эндокардит, септицемию, синдром токсического шока, инфекционный артрит или инфекцию протеза сустава, катетера или имплантированного инородного тела.

25. Способ по любому из пп. 22—24, где по меньшей мере один симптом инфекции, вызванной *S. aureus*, выбран из группы, состоящей из зуда, покраснения,

сыпи, отежности, тошноты, рвоты, диареи, обезвоживания, снижения кровяного давления, лихорадки, спутанности сознания, болей в мышцах, боли в животе, опухания суставов и боли в суставах.

26. Способ предупреждения инфекции, вызванной *S. aureus*, при этом способ включает профилактическое введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1—17 или фармацевтической композиции по п. 18 субъекту, нуждающемуся в этом.

27. Способ по п. 26, где субъект представляет собой пациента, подвергшегося хирургическому вмешательству, субъект перенес ранение или представляет собой индивидуума, перенесшего ожоговую травму.

28. Способ по любому из пп. 22—26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

29. Способ по п. 28, где второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из антибиотика, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств) и другого антитела к *S. aureus*.

30. Способ по п. 29, где второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело, а антитело представляет собой антитело к альфа-токсину.

31. Способ по п. 29, где второе терапевтическое средство представляет собой антибиотик, выбранный из группы, состоящей из пенициллина, оксациллина,

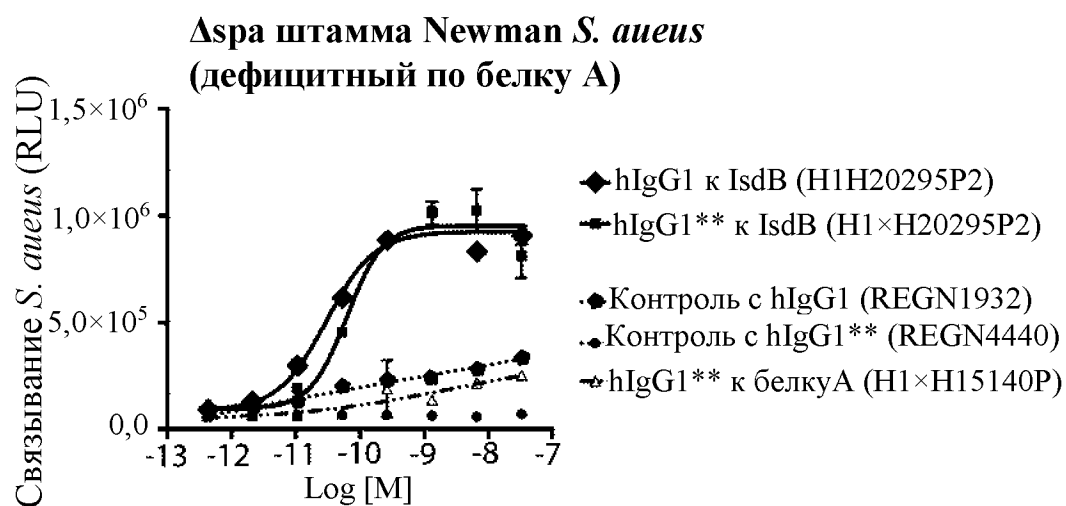
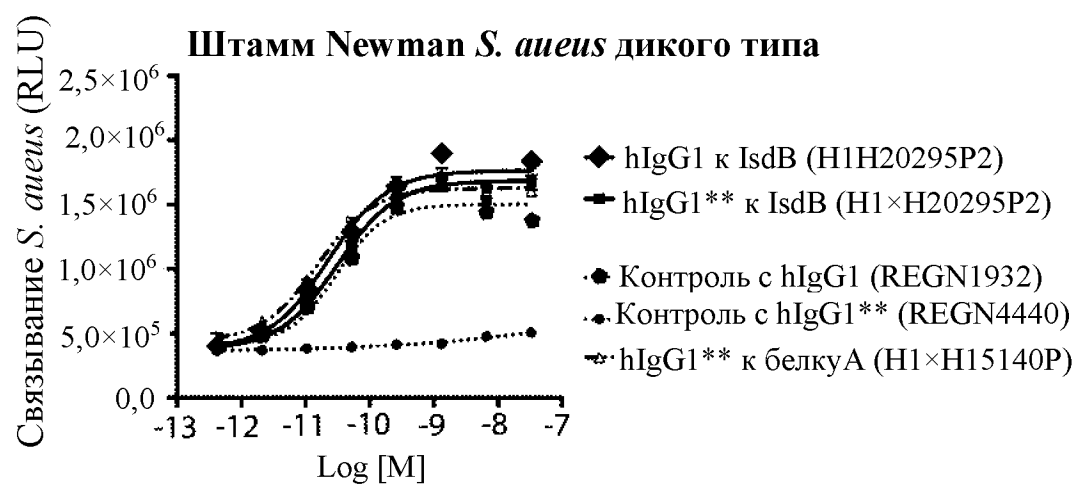
рифампицина, флуклоксациллина, диклоксациллина, цефазолина, цефалотина, цефалексина, нафциллина, клиндамицина, линкомицина, линезолида, даптомицина, эритромицина, ванкомицина, гентамицина, доксициклина и триметопримасульфаметоксазола.

32. Способ по любому из пп. 22—31, где фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутримышечно, интраназально, местно или перорально.

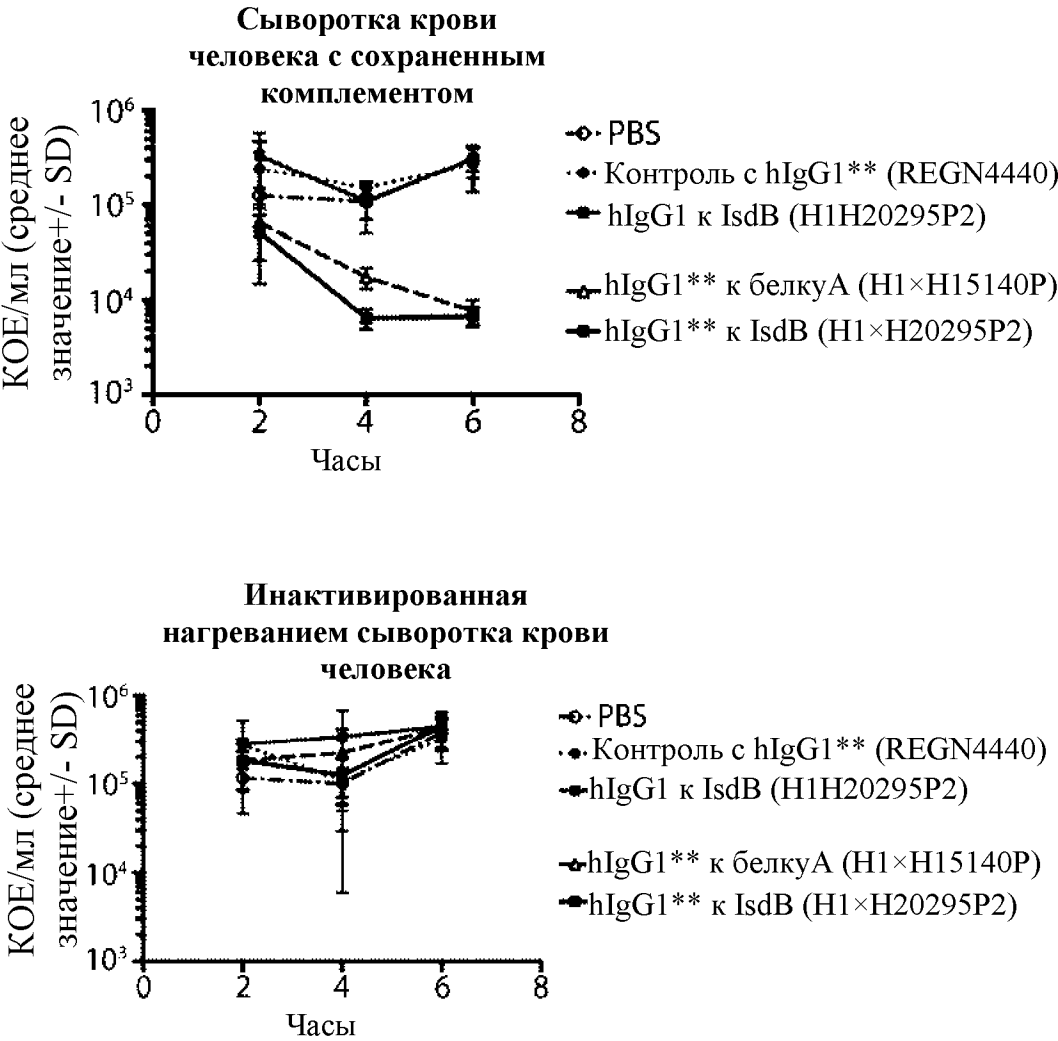
33. Способ предупреждения, лечения или уменьшения тяжести инфекции, вызванной *S. aureus*, или уменьшения частоты возникновения или тяжести инфекции, вызванной *S. aureus*, у субъекта, имеющего катетер, протез сустава или любое другое инородное тело, при этом способ включает введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1—17 или фармацевтической композиции по п. 18 субъекту, нуждающемуся в этом.

34. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с антигеном стафилококка, где антитело характеризуется ослабленным связыванием Fc с белком A, SpsQ или гомологичным белком.

35. Способ предупреждения, лечения или уменьшения тяжести стафилококковой инфекции или уменьшения частоты возникновения или тяжести стафилококковой инфекции у субъекта, выбранного из группы, состоящей из человека, коровы, собаки, лошади, кошки, примата, отличного от человека, козы и кролика, при этом способ включает введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п. 34 или фармацевтической композиции по п. 18 субъекту, нуждающемуся в этом.

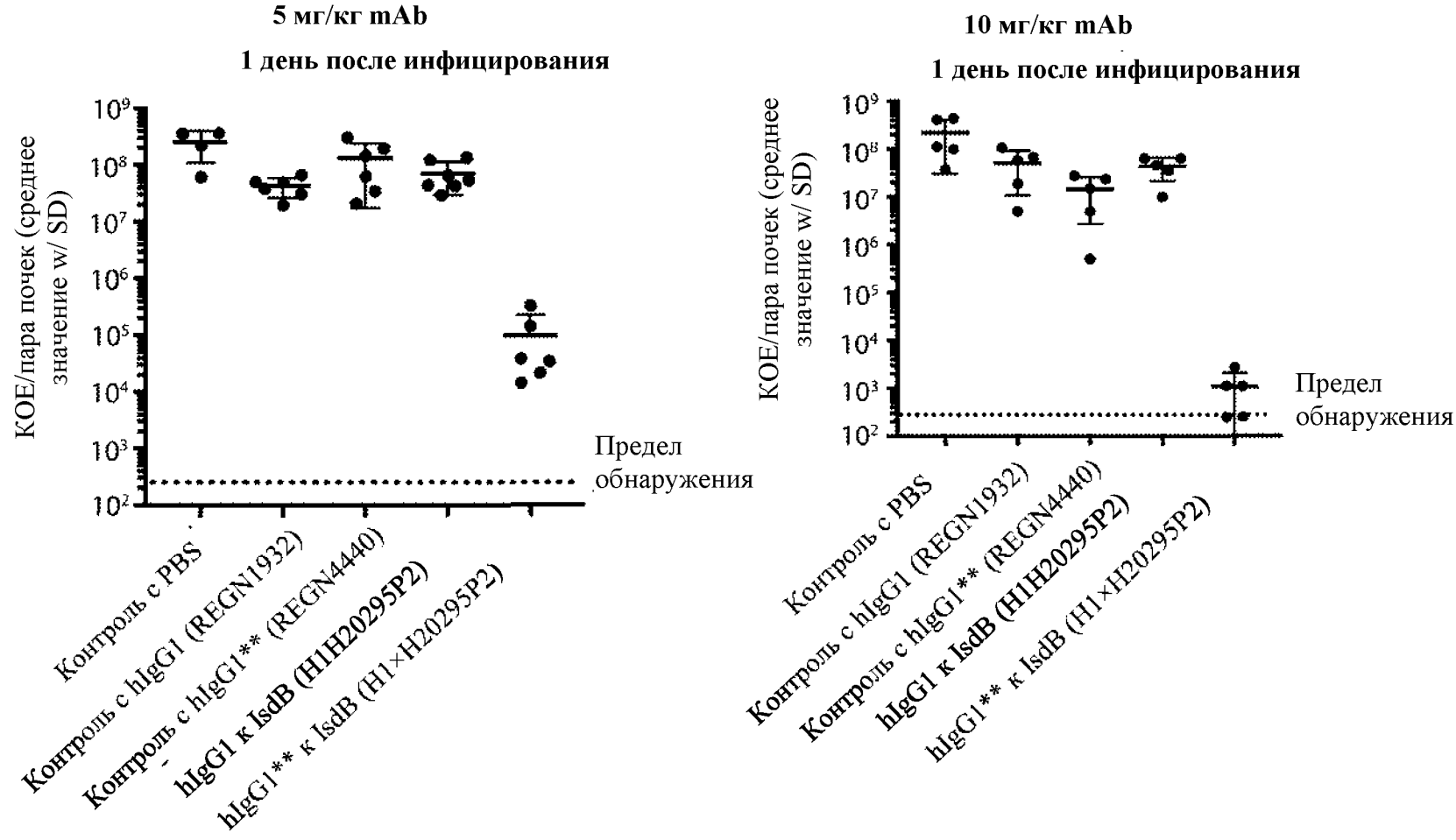


Фиг. 1

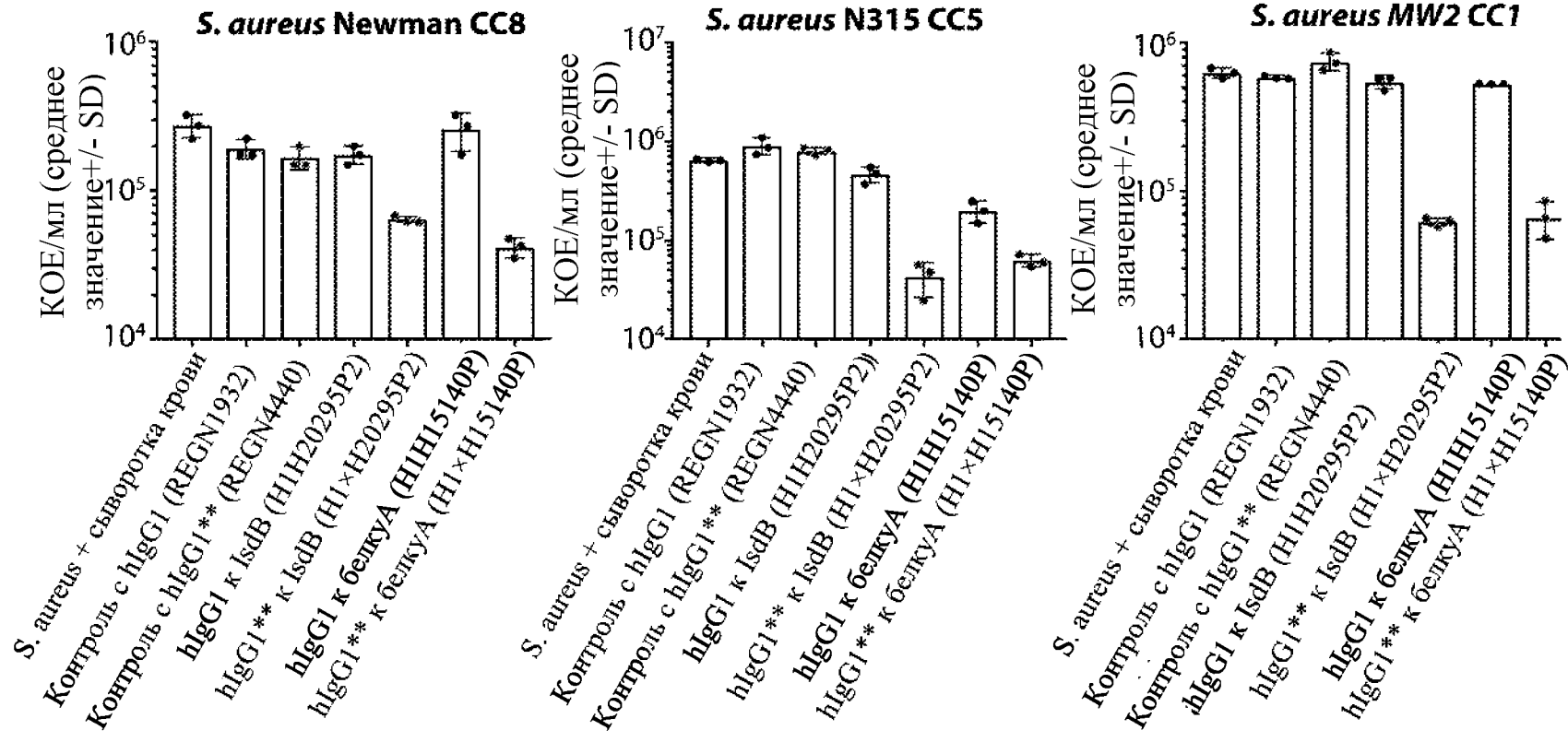


Фиг. 2

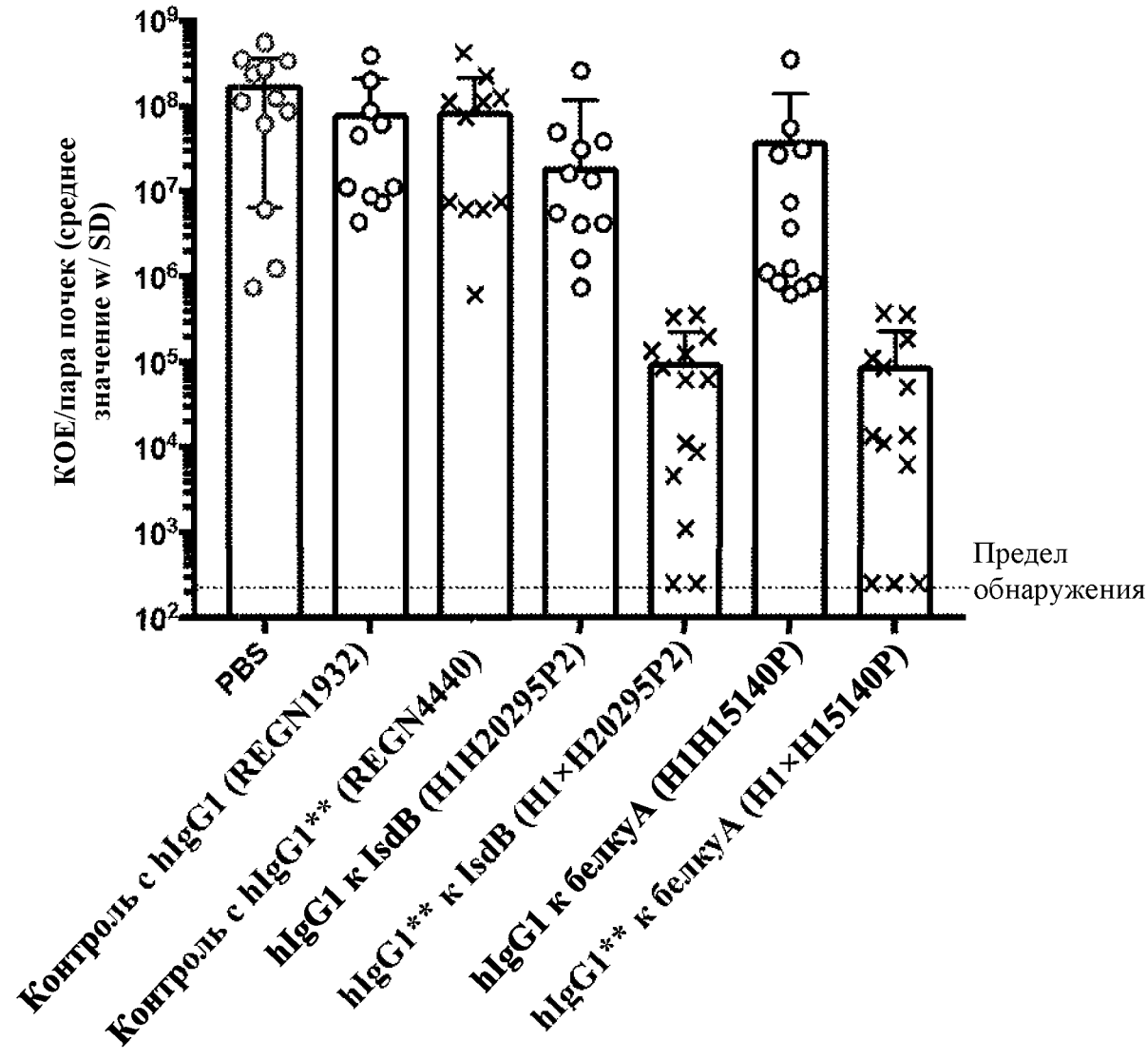
Фиг. 3



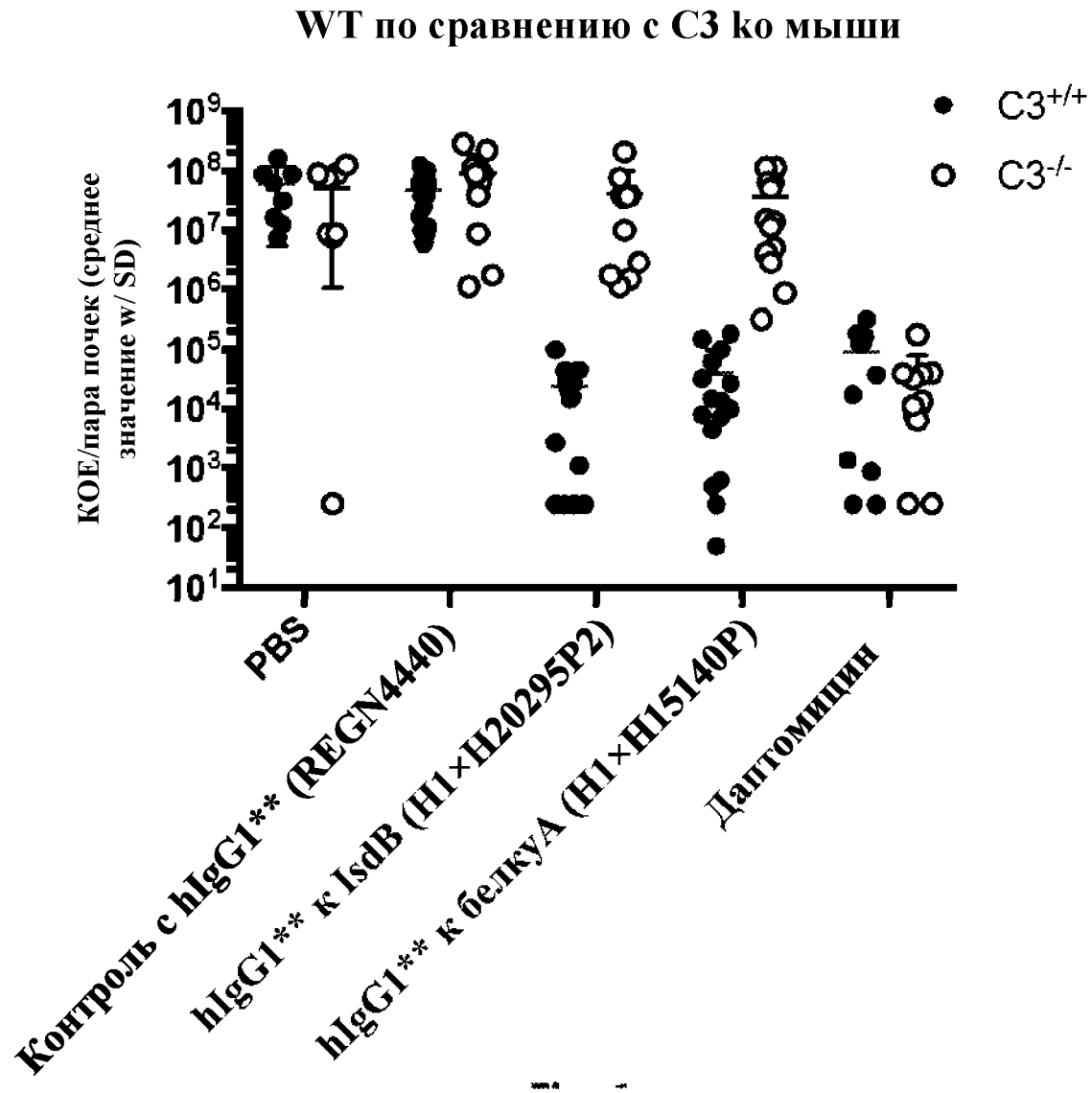
Фиг. 4



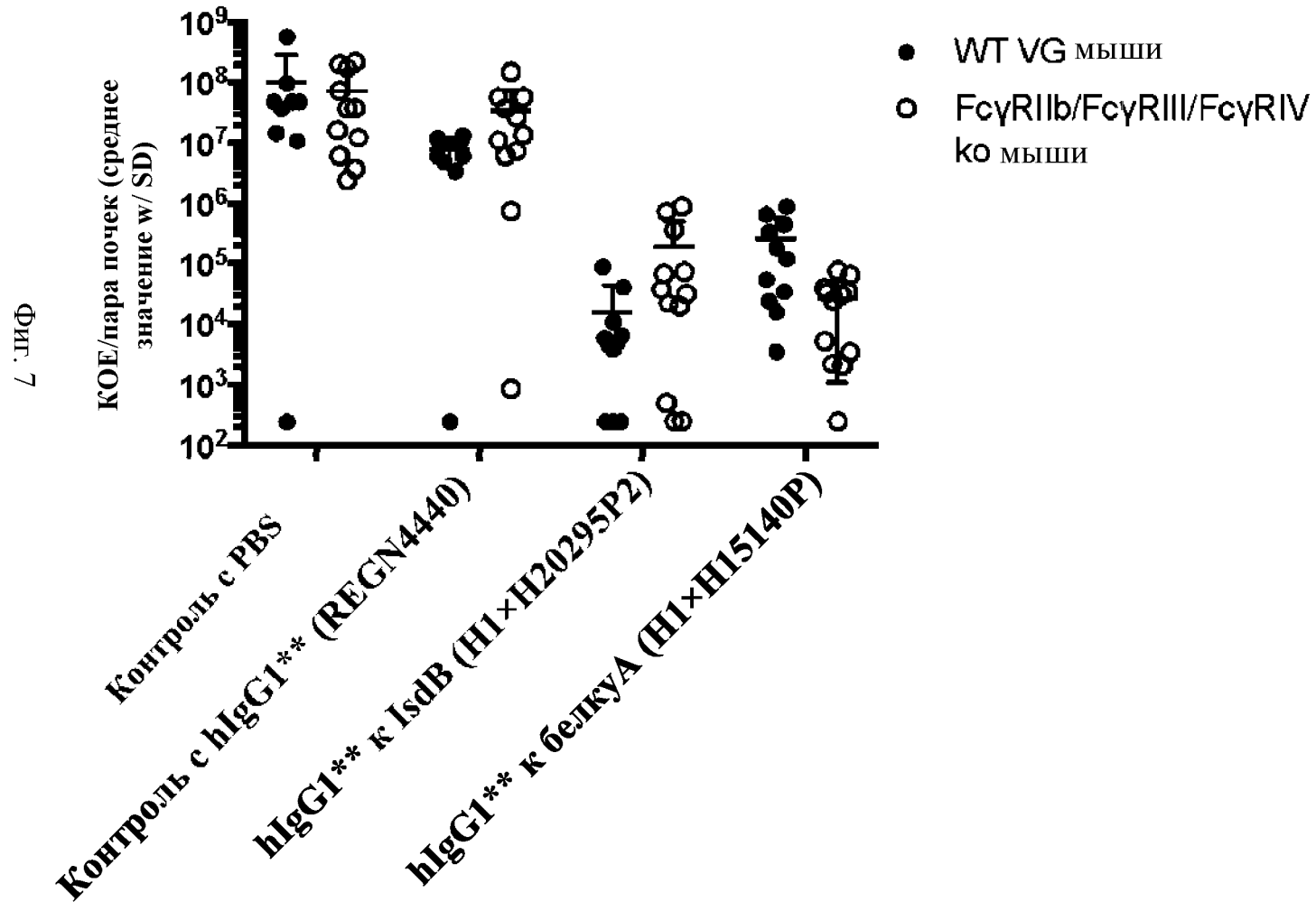
Фиг. 5

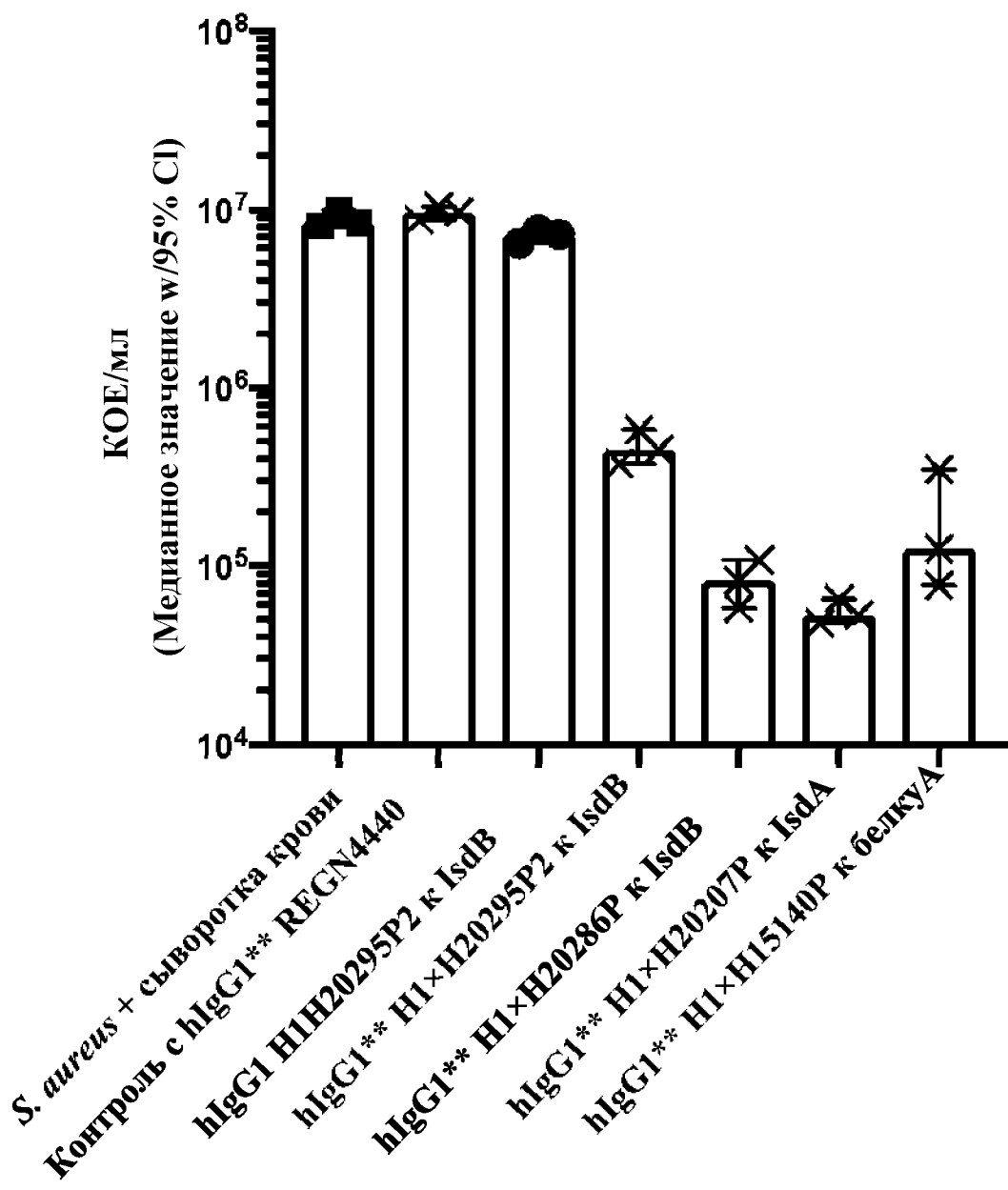


Фиг. 6

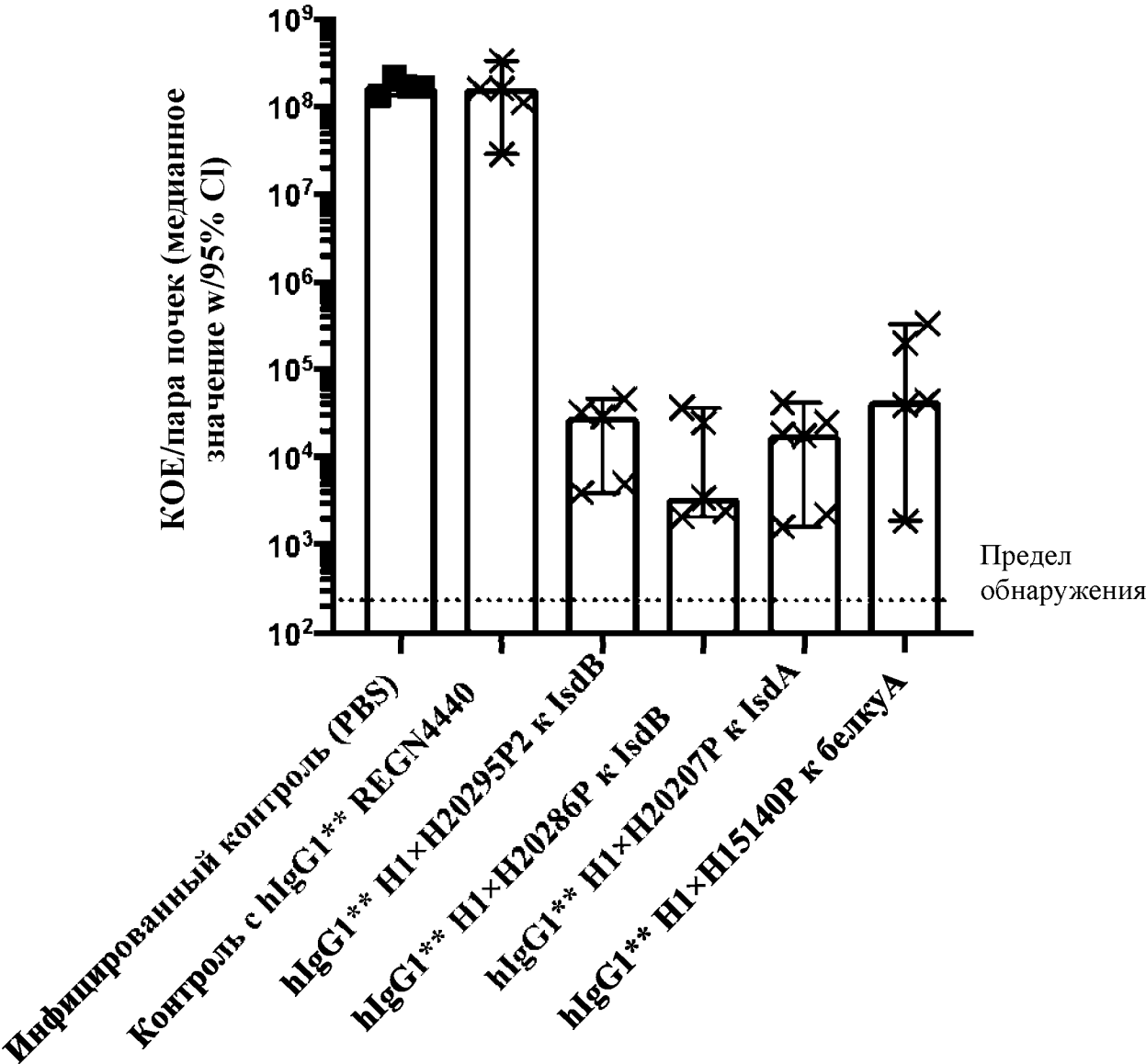


WT по сравнению с FcγRIIb/FcγRIII/FcγRIV ko мыши

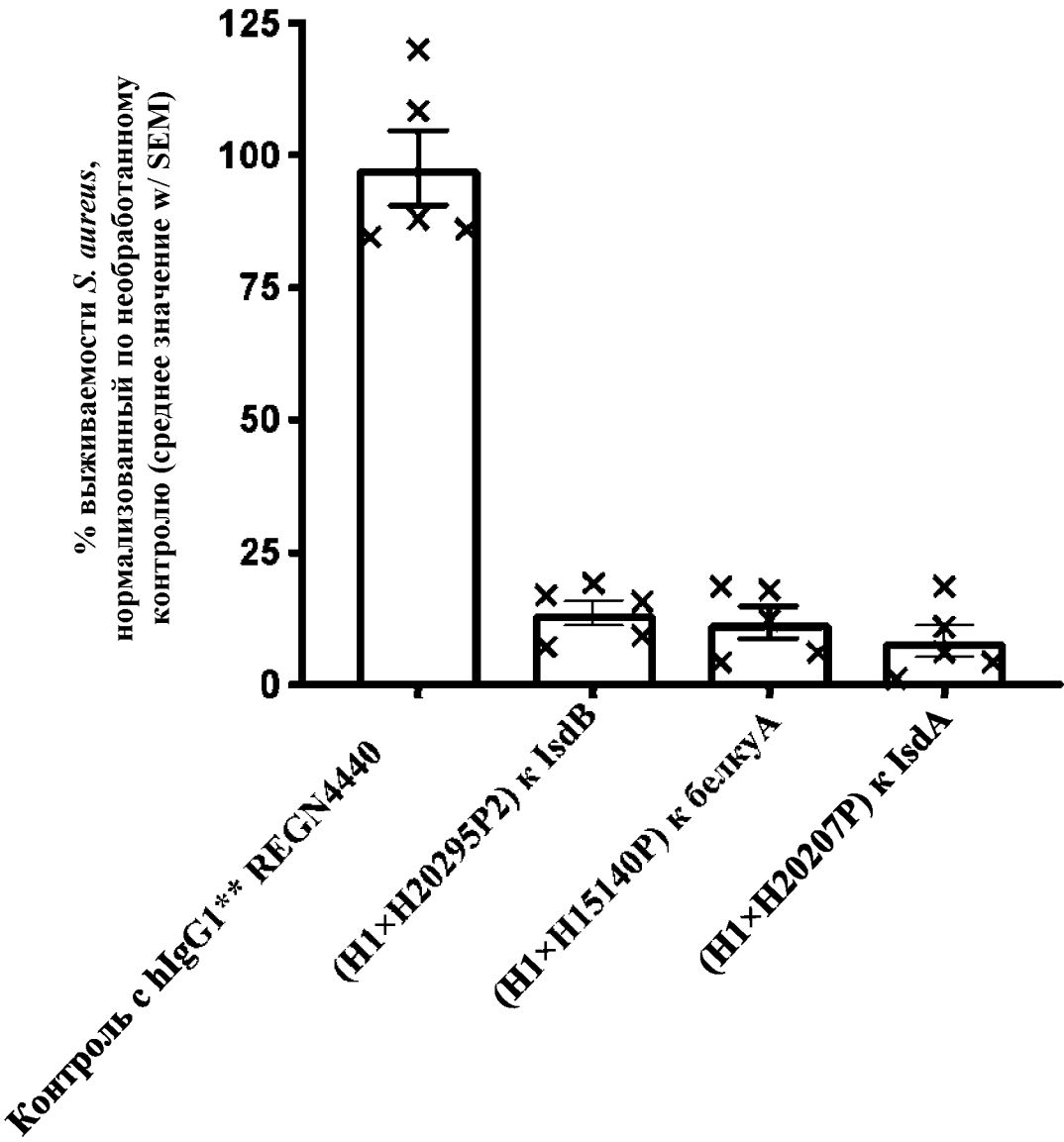




Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10