



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.14

(21) Номер заявки
201991643

(22) Дата подачи заявки
2018.01.02

(51) Int. Cl. **C07K 16/12** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ТОКСИНУ ГЕМОЛИЗИНУ А S.aureus

(31) 62/441,786

(32) 2017.01.03

(33) US

(43) 2020.01.20

(86) PCT/US2018/012044

(87) WO 2018/128973 2018.07.12

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

(72) Изобретатель:
**Коппи Алида, Мэйсон Питер, Олсон
Уилльям (US)**

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

(56) FOLETTI DAVIDE ET AL.: "Mechanism of Action and In Vivo Efficacy of a Human-Derived Antibody against Staphylococcus aureus[alpha]-Hemol", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 425, no. 10, 13 February 2013 (2013-02-13), pages 1641-1654, XP028531241, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2013.02.008, page 1643, left-hand column, paragraph 2, figure 1b, page 1645, right-hand column - page 1646, left-hand column, paragraph 1, figure 4, figure 6a, page 1649, left-hand column, paragraph 1, figure 6

C. TKACZYK ET AL.: "Identification of Anti-Alpha Toxin Monoclonal Antibodies That Reduce the Severity of Staphylococcus aureus Dermonecrosis and

Exhibit a Correlation between Affinity and Potency", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 19, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 377-385, XP055155965, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CDLI.05589-11, abstract, figure 6, figure 8

EP-A1-2284193

WO-A2-2012109285

US-A1-2013164308

E-CHIANG LEE ET AL.: "Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 4, 16 March 2014 (2014-03-16), pages 356-363, XP055131583, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2825, page 361, figure 6, page 362, left-hand column, paragraph 2

RAGLE B.E. ET AL.: "Anti-alpha-hemolysin monoclonal antibodies mediate protection against Staphylococcus aureus pneumonia", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 77, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 2712-2718, XP008116015, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.128/IAI.00115-09 [retrieved on 2009-04-20], abstract

WO-A1-2007145689

F.M. GONL ET AL.: "E. coli a-hemolysin: a membrane-active protein toxin", Brazilian Journal of medical and biological research, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 1019-1034, XP055460343, ISBN: 978-0-12-088445-2 Retrieved from the Internet: URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/bc4e/d84725e18f7c8b7c2c8026562914ab0c742e.pdf> [retrieved on 2018-03-16], the whole document

(57) В изобретении предложены антитела, которые связываются с токсином гемолизином А Staphylococcus aureus, и к способам их применения. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с гемолизином А. Антитела по настоящему изобретению пригодны для ингибирования или нейтрализации активности гемолизина А, таким образом обеспечивая средства профилактики или лечения заболевания или нарушения, связанного с гемолизином А, такого как инфекция, вызываемая S.aureus. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используют в лечении по меньшей мере одного симптома или осложнения инфекции, вызываемой S.aureus.

Область техники

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с токсином гемолизином A *Staphylococcus aureus*, а также к терапевтическим и диагностическим способам применения таких антител и фрагментов.

Уровень техники

Staphylococcus aureus представляет собой грамположительную факультативную аэробную бактерию, которая часто заселяет кожу и носовую полость здоровых индивидов. Настоящая бактерия считается оппортунистическим патогеном и может вызывать ряд заболеваний/патологических состояний во многих участках тела. Во всем мире она является основной причиной инфекций кровяного русла, кожи и мягких тканей, а также инфекций дыхательной системы. Частота внутрибольничных и внебольничных инфекций, вызываемых *S.aureus*, увеличивается, а усилиям по борьбе с этими инфекциями мешает появление штаммов, резистентных к лекарственным средствам, особенно штаммов, резистентных к метициллину или MRSA.

S.aureus экспрессирует ряд факторов вирулентности (как экспрессируемых, так и секретируемых клеточной поверхностью), которые способствуют бактериальной инвазии и диссеминации в хозяине. Среди секретируемых факторов вирулентности присутствуют ряд токсинов, наиболее значимым из которых является порообразующий токсин гемолизин A. Гемолизин A *S.aureus* представляет собой секретируемый мономер с молекулярной массой 33 кДа, который олигомеризуется в гептамерную структуру в мембране клеток-хозяев с образованием поры, приводя к лизису клеток, разрушению эпителиального барьера, воспалению и повреждению тканей (Berube et al., (2013), *Toxins*, 5:1140-1166).

Гемолизин A лизирует множество типов клеток млекопитающих, в том числе тромбоциты, моноциты, эндотелиоциты и эпителиальные клетки. Было сделано предположение, что скорее один или несколько из этих типов клеток являются физиологически релевантными мишенями гемолизина A, а не эритроциты (красные кровяные клетки), поскольку красные кровяные клетки человека чувствительны к лизису только при воздействии высоких концентраций гемолизина A (Hildebrand et al., (1991), *J. Biol. Chem.* 266:17195-17200; Wilke et al., (2010), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:13473-13478; Berube et al., (2013), *Toxins*, 5:1140-1166).

Было показано, что гемолизин A играет роль при пневмонии, дермонекрозе, эндокардите и сепсисе в животных моделях инфекции, вызываемой *S.aureus* (Tkaczyk et al., (2012), *Clin. Vaccine Immunol.* 19:377-385, и Kennedy et al., (2010), *J. Infect. Dis.* 202:1050-1058). *S.aureus* является основной причиной инфекций кожи и мягких тканей (Moran, et al. (2006), *N. Engl. J. Med.* 355:666-674), часто приводящих к целлюлиту и абсцессам кожи. В мышинных моделях активная иммунизация нетоксикогенной формой гемолизина A или пассивная иммунизация антисывороткой, специфичной к гемолизу A, или моноклональными антителами (mAb) значительно уменьшает размер поражений кожи и предупреждает дермонекроз, вызванный штаммами *S.aureus*, продуцирующими гемолизин A (Kennedy et al., (2010), *J. Infect. Dis.* 202:1050-1058; Tkaczyk et al., (2012), *Clin. Vaccine Immunol.* 19:377-385). *S.aureus* также является основной причиной пневмонии у госпитализированных пациентов (Kollef et al., (2005), *Chest* 128:3854-3862 (Erratum in *Chest* 129:831); Short et al., (2006), *Crit. Care* 10:R97), и было показано, что он играет роль в мышинных моделях легочной инфекции (Bubeck Wardenberg et al., (2007), *Infect. Immun.* 75:1040-1044). Активная иммунизация нетоксикогенной формой гемолизина A или пассивная иммунизация антисывороткой, специфичной к гемолизу A, или mAb значительно снижает заболеваемость и смертность в мышинных моделях пневмонии (Bubeck Wardenburg and Schneewind, (2008), *J. Exp. Med.* 205:287-294; Hua et al., (2014), *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:1108-1117).

Staphylococcus aureus представляет собой основную причину инфекции в больницах и во внебольничных условиях.

Появление резистентных к антибиотикам штаммов *S.aureus*, таких как резистентный к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA), которые сложнее поддаются лечению стандартными типами антибиотиков, является актуальной проблемой в клинической медицине и требует разработки новых подходов к антибактериальной профилактике и терапии (Kennedy et al., (2010), *J. Infect. Dis.* 202:1050-1058).

Краткое описание сущности изобретения

В настоящем изобретении предложены полностью человеческие моноклональные антитела (mAb) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемолизином A *Staphylococcus aureus*. Такие антитела могут быть пригодны для нейтрализации активности гемолизина A. Настоящие антитела могут способствовать предупреждению, остановке прогрессирования или уменьшению тяжести инфекций, вызываемых *S.aureus*, или уменьшению количества, длительности или тяжести повторного проявления инфекции, или ослабления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекциями. В некоторых случаях настоящие антитела могут быть использованы для предупреждения или лечения патологического состояния или показания, ассоциированных с инфекцией, вызываемой *S.aureus*, такой как дермонекроз, инфекции кожи и мягких тканей (в том числе абсцессы), инфекции в месте хирургического вмешательства, инфекции эндопротезов суставов, бактериемия, септицемия, септический артрит, менингит, остеомиелит, эндокардит, пневмония, синдром токсического шока, мастит, а также фурункулез и карбункулез (фурункулы). Такие антитела могут быть использованы

в отдельности или в сочетании со вторым агентом, пригодным для лечения инфекций, вызываемых *S.aureus*. В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к гемолизу А, могут быть введены терапевтически в сочетании со вторым агентом для уменьшения тяжести инфекции, вызываемой *S.aureus*, или для уменьшения количества, продолжительности или тяжести повторного проявления инфекции или ослабления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*. В некоторых случаях комбинированная терапия может быть использована для лечения патологического состояния или показания, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*, такой как дермонекроз, инфекции кожи и мягких тканей (в том числе абсцессы), инфекции в месте хирургического вмешательства, инфекции эндопротезов суставов, бактериемия, септицемия, септический артрит, менингит, остеомиелит, эндокардит, пневмония, синдром токсического шока, мастит, а также фурункулез и карбункулез (фурункулы). В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть использованы профилактически в качестве самостоятельной терапии для защиты пациентов, которые подвержены риску развития инфекции, вызываемой *S.aureus*. Например, определенные популяции пациентов могут быть подвержены риску развития инфекции, вызываемой *S.aureus*, в том числе пациенты пожилого возраста, пациенты, которые имеют ослабленные иммунные системы, или пациенты, которые подвержены более высокому риску нозокомиальных инфекций, такие как пациенты в послеоперационном периоде. Любая из этих популяций пациентов может получить положительный результат от лечения антителами по настоящему изобретению, в случае их введения в отдельности или в сочетании со вторым агентом.

Антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, у пациента. Антитела могут быть полноразмерными (например, антитела IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab')₂ или scFv-фрагмент), а также могут быть модифицированными с целью воздействия на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., (2000), J. Immunol. 164:1925-1933) или увеличения периода полужизни mAb (Zalevsky et al., (2010), Nature Biotechnology, 28:157-159). Настоящее изобретение включает в себя любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит любую из указанных в настоящем документе областей V_H, связанных с константной областью тяжелой цепи (например, человеческой константной областью), такую как гамма (например, гамма-1, гамма-2, гамма-3 или гамма-4), дельта, альфа, мю или эпсилон, и/или любую из указанных в настоящем документе областей V_L, связанных с константной областью легкой цепи (например, человеческой константной областью), такую как лямбда или каппа.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полностью человеческому моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с гемолизином А.

В некоторых случаях человеческое моноклональное антитело связывается с гемолизином А дикого типа (SEQ ID NO: 291) или модифицированным гемолизином А (SEQ ID NO: 295).

В одном варианте осуществления выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с гемолизином А со значением K_D, равным или менее 10⁻⁷ М, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из:

(a) связывается с гемолизином А дикого типа при 37°C с константой связывания при равновесии диссоциации (K_D) менее чем около 80 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связывается с гемолизином А дикого типа при 37°C с диссоциационным периодом полужизни (t_{1/2}) более чем около 0,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(c) связывается с гемолизином А дикого типа при 25°C со значением K_D менее чем около 30 нМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(d) связывается с гемолизином А дикого типа при 25°C со значением t_{1/2} более чем около 1,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(e) связывается с модифицированным гемолизином А при 37°C с константой связывания при равновесии диссоциации (K_D) менее чем около 20 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(f) связывается с модифицированным гемолизином А при 37°C с диссоциационным периодом полужизни (t_{1/2}) более чем около 0,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(g) связывается с модифицированным гемолизином А при 25°C со значением K_D менее чем около 10 нМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса; и

(h) связывается с модифицированным гемолизином А при 25°C со значением t_{1/2} более чем около 1,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых случаях выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемолизином А, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариационной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102,

122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262 и 282; и/или три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270. Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в настоящей области техники и могут быть использованы для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях варибельной(ых) области(ей) тяжелой цепи (HCVR) и/или варибельной(ых) области(ей) легкой цепи (LCVR), раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные условные обозначения, которые могут быть использованы для определения границ CDR, включают в себя, например, определение по Кабату, определение по Чотиа и определение по AbM. В общем случае определение по Кабату основано на варибельности последовательности, определение по Чотиа основано на положении структурных петлевых областей, а определение по AbM является компромиссным решением между подходами Кабата и Чотиа. См., например, Rabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 273:927-948; и Martin et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9212. Базы настоящих общего пользования также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемолитином А, содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262 и 282.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемолитином А, содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270.

В некоторых случаях выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемолитином А, содержит (а) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262 и 282; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270.

В одном варианте осуществления выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемолитином А, содержит:

(а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 184, 204, 224, 244, 264 и 284;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 186, 206, 226, 246, 266 и 286;

(с) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 188, 208, 228, 248, 268 и 288;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252 и 272;

(е) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 194, 214, 234, 254 и 274;

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256 и 276.

В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено полностью человеческое моноклональное антитело или его фрагмент, который связывается с гемолитином А, при этом антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько из следующих характеристик:

(i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262 и 282, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность;

(ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность;

(iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 188, 208, 228, 248, 268, 288, 536, 552, 568 и 584, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256 и 276, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность;

(iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из груп-

пы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 184, 204, 224, 244, 264 и 284, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 186, 206, 226, 246, 266 и 286, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252 и 272, или по сути аналогичной ей последовательности, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 194, 214, 234, 254 и 274, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; и/или

(v) связывается с гемолизином А со значением K_D , равным или менее 10^{-7} М, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с гемолизином А с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим области, определяющие комплементарность (CDR), вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, и 282; и CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает тот же самый эпитоп гемолизина А, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262 и 282; и CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемолизином А, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 182/190, 202/210, 222/230, 242/250, 262/270 и 282/270.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антигемолизин А антитела или их фрагменты. Рекомбинантные экспрессионные векторы, несущие нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также включены в настоящее изобретение, как и способы получения антител с помощью культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела и извлекать продуцируемые антитела.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело или его фрагмент, содержащий HCVR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 21, 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261 и 281, или по сути идентичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной ей.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит LCVR, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 29, 49, 69, 89, 109, 129, 149, 169, 189, 209, 229, 249 и 269, или по сути идентичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной ей.

В некоторых случаях в настоящем изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, содержащий домен HCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 27, 47, 67, 87, 107, 127, 147, 167, 187, 207, 227, 247, 267 и 287, или по сути идентичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной ей; и домен LCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 35, 55, 75, 95, 115, 135, 155, 175, 195, 215, 235, 255 и 275, или по сути идентичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной ей.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено антитело или его

фрагмент, содержащий домен HCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 43, 63, 83, 103, 123, 143, 163, 183, 203, 223, 243, 263, 283, 563 и 579, или по сути их аналогичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательностью; домен HCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 45, 65, 85, 105, 125, 145, 165, 185, 205, 225, 245, 265 и 285, или по сути их аналогичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательностью; домен LCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251 и 271, или по сути их аналогичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательностью; и домен LCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 33, 53, 73, 93, 113, 133, 153, 173, 193, 213, 233, 253 и 273, или по сути их аналогичной последовательностью, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемOLIзином А, как описано в настоящем документе, может быть связан с детектируемой меткой, такой как радионуклидная метка или метка, выявляемая с помощью МРТ.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с гемOLIзином А, как описано выше или в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит полностью человеческое моноклональное антитело, которое связывается с гемOLIзином А, имеющее одну или несколько из характеристик, описанных выше или в настоящем документе. В одном варианте осуществления антитело связывается с гемOLIзином А со значением K_D , равным или менее 10^{-7} М. В различных вариантах осуществления композиция содержит антитело, которое связывается с гемOLIзином А и имеет пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 182/190, 202/210, 222/230, 242/250, 262/270 и 282/270. В настоящем изобретении также предложено выделенное человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(ii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

(iii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(iv) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;

(v) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

(vi) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118;

(vii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138;

(viii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158;

(ix) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178;

(x) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198;

(xi) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 220, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218;

(xii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238;

(xiii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258;

(xiv) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278;

или (xv) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290.

В некоторых случаях в настоящем изобретении описана композиция, которая представляет собой комбинацию антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению и второго терапевтического агента. Второй терапевтический агент может представлять собой лекарственное средство на основе низкомолекулярной молекулы, белок/полипептид, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, такую как антисмысловой олигонуклеотид или миРНК. Второй терапевтический агент может быть синтетического или природного происхождения. Второй терапевтический агент может представлять собой любой агент, который предпочтительно комбинируют с антителом или его фрагментом по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой агент, который облегчает нейтрализацию или ослабление любого(ых) возможного(ых) побочного(ых) эффекта(ов), ассоциированного(ых) с антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела по настоящему изобретению, в случае, если такой(ие) побочный(ые) эффект(ы) должен(ы) возникнуть(и).

Кроме того, будет понятно, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в видах комбинированной терапии, т.е. антитела и фармацевтически приемлемые композиции могут быть введены одновременно, до или после одного или нескольких других необходимых терапевтических средств или медицинских процедур. При конкретной комбинации видов лечения (терапевтических средств или процедур) для применения в комбинированном режиме будет учитываться совместимость необходимых терапевтических средств и/или процедур, а также необходимый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. Также следует понимать, что используемые виды терапии могут достигать необходимого эффекта при том же самом нарушении (например, антитело может быть введено одновременно с другим агентом, используемым для лечения того же самого нарушения) или они могут достигать различных эффектов (например, контроль любых побочных эффектов). Используемые в настоящем документе дополнительные терапевтические агенты, которые обычно вводят для лечения или предупреждения определенного заболевания или патологического состояния, являются подходящими для заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению. При одновременном введении нескольких терапевтических средств дозы могут быть соответствующим образом скорректированы, как это признано в соответствующей области.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения, лечения или контроля первичных инфекций, вызываемых *Staphylococcus aureus*, и ослабления, устранения или предупреждения рецидива вследствие инфекций, вызываемых *Staphylococcus aureus*. В некоторых случаях настоящее изобретение включает способ предупреждения и/или лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*, такой как дермoneкрроз, инфекции кожи и мягких тканей (в том числе абсцессы), инфекции в месте хирургического вмешательства, инфекции эндопротезов суставов, бактериемия, сепсис, септический артрит, менингит, остеомиелит, эндокардит, пневмония, синдром токсического шока, мастит, а также фурункулез и карбункулез (фурункулы). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения пациента, страдающего инфекцией, вызываемой *S.aureus*, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*, или остановки прогрессирования инфекции, вызываемой *S.aureus*, при этом способ включает в себя введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с гемолизином А; или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с гемолизином А, в результате чего патологическое состояние или заболевание, ассоциированное с инфекцией, вызываемой *Staphylococcus aureus*, предупреждают или уменьшают по тяжести и/или продолжительности, или по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированное с патологическим состоянием или заболеванием, предотвращают или нормализуют, или частоту и/или продолжительность или тяжесть инфекции, вызываемой *S.aureus*, снижают. В различных вариантах осуществления способов, описанных выше, бактерии *S.aureus* могут быть резистентными к одному или нескольким типам лечения антибиотиками. В одном варианте осуществления бактерии представляют

собой резистентные к метициллину *S.aureus* (MRSA).

В некоторых вариантах осуществления способа фармацевтическую композицию, содержащую антитела по настоящему изобретению, вводят пациенту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, перорально или внутримышечно.

В связанных вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя применение выделенного антигемолизина А антитела или антигенсвязывающего участка антитела по настоящему изобретению при изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания или нарушения, связанного с или вызываемого инфекцией, вызываемой *S.aureus*, или наличием токсина гемолизина А. Настоящее изобретение также включает в себя применение выделенного антигемолизина А антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для предупреждения или лечения заболевания или нарушения, связанного с или вызываемого инфекцией, вызываемой *S.aureus*, или присутствием токсина гемолизина А. В различных вариантах осуществления эти заболевания или нарушения включают в себя дермонекроз, инфекции кожи и мягких тканей (в том числе абсцессы), инфекции в месте хирургического вмешательства, инфекции эндопротезов суставов, бактериемию, сепсис, септический артрит, менингит, остеомиелит, эндокардит, пневмонию, синдром токсического шока, мастит, фурункулез и карбункул (фурункулы). В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя применение выделенного антигемолизина А антитела или его антигенсвязывающего фрагмента при изготовлении лекарственного средства для лечения инфекции, вызываемой *S.aureus*. В некоторых случаях настоящее изобретение включает в себя применение антигемолизина А антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано выше или в настоящем документе, для лечения пациента, страдающего от или подверженного риску развития инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя применение антигемолизина А антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано выше или в настоящем документе, для лечения пациента, страдающего от дермонекроза, инфекций кожи и мягких тканей (в том числе абсцессов), инфекций в месте хирургического вмешательства, инфекций эндопротезов суставов, бактериемии, сепсиса, септического артрита, менингита, остеомиелита, эндокардита, пневмонии, синдрома токсического шока, мастита, фурункулеза и карбункула (фурункулов).

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображено связывание антигемолизина А антител с гемолизином А *S.aureus*.

На фиг. 2а-2с изображено связывание антигемолизина А антител с F-субъединицами двухкомпонентных токсинов *S.aureus*: на фиг. 2а изображено связывание с LukF; на фиг. 2b изображено связывание с LukD; и на фиг. 2с изображено связывание с HlgB.

На фиг. 3а-3с изображено связывание антигемолизина А антитела H1H15381P с компонентами двухкомпонентных токсинов *S.aureus*: на фиг. 3а изображено связывание с LukF, LukS и LukE; на фиг. 3b изображено связывание с HlgA и HlgC; и на фиг. 3с изображено связывание с дельта-токсином.

Фиг. 4а и 4b: на фиг. 4а изображено блокирование индуцированной токсинами активности ADAM10 антигемолизина А антителом H1H15377P, H1H15381P или H1H15399P, а на фиг. 4b изображено предупреждение связывания гемолизина А с мембранами эритроцитов кролика с помощью антигемолизина А антитела H1H15377 или H1H15377.

На фиг. 5а-5с изображен размер дермонекротических поражений у мышей, инфицированных *S.aureus* CA-127 и обработанных различными антителами (H1H15377P, H1H15381P, H1H15399P, LTM14, LC10 или контрольным антителом) в концентрации 5, 0,5 или 0,125 мг/кг.

На фиг. 6а-6с изображен размер дермонекротических поражений у мышей, инфицированных *S.aureus* Newman и обработанных различными антителами (H1H15377P, H1H15381P, H1H15399P, LTM14, LC10 или контрольным антителом) в концентрации 5, 0,5 или 0,125 мг/кг.

На фиг. 7а и 7b изображено содержание бактерий *S.aureus* CA-127 (MRSA) или *S.aureus* Newman (MSSA) в коже мышей, которым вводили различные антигемолизин А mAb (H1H15377P, H1H15381P, H1H15399P, LTM14, LC10 или контрольное антитело).

На фиг. 8а и 8b изображена бактериальная нагрузка в легких мышей, инфицированных *S.aureus* CA-127, обработанных различными антителами (H1H15377P, H1H15381P, H1H15399P, LTM14, LC10 или контрольным антителом) в концентрации 1,25 или 0,325 мг/кг.

Подробное описание изобретения

Перед описанием способов настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается определенными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания определенных вариантов осуществления и ее не следует рассматривать как ограничивающую, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе,

имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть применены на практике или при испытании настоящего изобретения, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Определения

Термины "гемолизин А" и "токсин гемолизин А" относятся взаимозаменяемо к мономерному белку с молекулярной массой 33 кДа, секретируемому *S.aureus*, который олигомеризируется в гептамерные структуры в мембране клеток-хозяев с образованием пор, приводя к лизису клеток, воспалению и повреждению тканей. Аминокислотная последовательность гемолизина А дикого типа показана в SEQ ID NO: 291. Аминокислотная последовательность модифицированного гемолизина А (мутант H35L) показана в SEQ ID NO: 295. Если не указано иное, ссылка на гемолизин А относится к форме дикого типа. H1a-H35L представляет собой гемолизин А, в котором гистидин в положении 35 замещен на лейцин. Это позволяет токсину осуществлять сборку на мембране клетки-хозяина вплоть до предварительного этапа образования пор, однако полностью функциональная пора не образуется. Это делает гемолизин А нетоксикогенным.

Термин "антитело", используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е. "молекул полноразмерного 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). Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным путем или искусственно. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Также возможно замещение одного или нескольких остатков CDR или исключение одного или нескольких CDR. Антитела были описаны в научной литературе, в которой один или два CDR могут быть исключены для связывания. Padlan et al. (FASEB J. 1995, 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и пришли к выводу, что только от около одной пятой до одной трети остатков CDR фактически контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002, J. Mol. Biol. 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не являются необходимыми), из областей CDR по Кабату, расположенных вне CDR по Чотиа, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток(и) не указан(ы), она обычно замещена аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности человеческих антител или консенсусе таких последовательностей. Положения для замещения в CDR и аминокислоты для замены также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

Полностью человеческие антигемолизин А моноклональные антитела, раскрытые в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации могут быть легко определены с помощью сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из баз настоящих антител общего пользования. Настоящее изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, при этом одна или несколько аминокислот в одном или нескольких каркасных областях и/или областях CDR мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходило, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека или до консервативной аминокислотной замены соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в настоящем документе совместно как "зародышевые мутации"). Специалист в настоящей области техники, начиная с последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе,

может легко получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходило. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например только мутированные остатки, обнаруженные в первых восьми аминокислотах FR1 или в последних восьми аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных остатков и/или остатков CDR мутируют до соответствующего остатка(остатков) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело изначально происходило). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или областях CDR, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, могут быть легко исследованы в отношении одного или нескольких необходимых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или повышенные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), ослабленная иммуногенность и т.п. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего подхода, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает в себя полностью человеческие антигемолизин А моноклональные антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает в себя антигемолизин А антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и др. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

Термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, предполагает включение в себя антител, имеющих вариабельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. В то же время термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, не предполагает включение mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты к FR последовательностям человека.

Термин "специфически связывается", или "связывается специфически с", или т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно устойчивым в физиологических условиях. Специфическое связывание может быть охарактеризовано с помощью равновесной константы диссоциации по меньшей мере около 1×10^{-6} М или менее (например, меньшее значение K_D обозначает более плотное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Описанные в настоящем документе антитела, которые связываются специфически с гемолизином А, были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например Biacore™. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в гемолизине А и с одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя различными областями гемолизина А, тем не менее считаются антителами, которые "специфически связываются", как используется в настоящем документе.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем mAb, имеющим аффинность связывания с гемолизином А, выражаемую в виде значения K_D , 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, измеряемого с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например Biacore™ или определения аффинности в растворе с помощью ИФА.

Термин "медленная скорость диссоциации", " K_{off} " или " k_d " предполагает описание антитела, которое диссоциирует в результате действия гемолизина А с константой скорости $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, определенной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, на-

пример Biacore™.

Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в настоящем документе, включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемые в настоящем документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с гемוליзином А.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как антибиотик, второе антигемолизин А антитело или антитело к цитокину, такому как IL-1, IL-6 или TGF-β, или любым другим терапевтическим компонентом, пригодным для лечения заболевания или патологического состояния, в том числе инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, инфекций кожи и мягких тканей (в том числе абсцессов), инфекций в месте хирургического вмешательства, инфекций эндопротезов суставов, бактериемии, септицемии, септического артрита, менингита, остеомиелита, эндокардита, пневмонии, синдрома токсического шока, мастита, фурункулеза и карбункулеза (фурункулов).

"Выделенное антитело", используемое в настоящем документе, предназначено для обозначения антитела, которое по сути не включает в себя других антител (Ab), имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенного антитела, которое специфически связывает гемOLIЗИН А или его фрагмент, по сути не включает в себя Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от гемOLIЗИНА А).

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", используемый в настоящем документе, относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в реальном времени путем выявления изменений в концентрациях белка в биосенсорной матрице, например, с помощью системы Biacore™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Термин "K_D", используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подмножество структурных эпитопов и имеют такие остатки, которые непосредственно влияют на аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоящими из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые являются химически активными поверхностными группировками молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда.

Термин "значительная идентичность" или "по сути идентичный" при обозначении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере в около 90% и более предпочтительно по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, по сути идентичная эталонной молекуле нуклеиновой кислоты, в определенных случаях кодирует полипептид, имеющий такую же или по сути аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "значительное сходство" или "по сути аналогичный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие пропуска по умолчанию имеют последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95, 98 или 99%. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой таковую, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не будет по сути изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отли-

чаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают в себя:

- 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин;
- 3) амидсодержащие 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.

Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992), *Science*, 256:1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей в случае полипептидов обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательности. С помощью программного обеспечения для анализа белка подбирают аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами; программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает идентичность выравниваний и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между искомой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой настоящих, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела для применения в способе по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифичные антитела могут быть специфическими для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические для более чем одного целевого полипептида. Формат иллюстративного биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, включает в себя использование первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, при этом первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом разница по меньшей мере в одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, лишенным разницы в аминокислоте. В одном варианте осуществления первый домен C_{H3} Ig связывается с белком А, а второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание с белком А, например модификацию H95R (согласно нумерации экзонов по IMGT; H435R согласно нумерации по EC). Второй домен C_{H3} может дополнительно включать в себя модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EC). Другие модификации, которые могут встречаться во втором домене C_{H3} , включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EC) в случае mAb IgG1; N44S, K52N и V82I (по IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае mAb IgG2 и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае mAb IgG4. Вариации в формате биспецифического антитела, описанные выше, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевается количество, которое приводит к необходимому эффекту, для которого оно вводится. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет определено специалистом в настоящей области техники с применением известных методов (см., например, Lloyd (1999), *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Общее описание

Токсин гемолизин A *Staphylococcus aureus* представляет собой секретируемый мономерный белок с молекулярной массой 33 кДа, который олигомеризуется в гептамерную структуру в мембране клеток-хозяев с образованием пор, приводя к лизису клеток, воспалению и повреждению тканей. Было показано, что гемолизин A играет роль при пневмонии, дермонекрозе, эндокардите и сепсисе.

Антитела, описанные в настоящем документе, демонстрируют специфическое связывание с гемолизином A и в некоторых вариантах осуществления могут быть пригодными для лечения пациентов, страдающих от инфекций, вызываемых *S. aureus*, или предупреждения таких инфекций. Использование таких антител может представлять собой эффективное средство лечения пациентов, страдающих от инфекции, вызываемой *S. aureus*, или они могут быть использованы для уменьшения тяжести симптомов инфекции, вызываемой *S. aureus*. Они могут быть использованы в отдельности или в виде вспомогательной терапии с другими терапевтическими фрагментами или формами, известными в настоящей области техники для лечения инфекции, вызываемой *S. aureus*, такими как, но не ограничиваясь ими, антибиотик, нестероидное противовоспалительное средство (NSIAD) (или другая паллиативный препарат) или кортикостероид, такой как преднизон. Они могут быть использованы в сочетании с дополнительными антителами, специфическими в отношении антигенов, отличных от гемолизина A, или могут сочетаться с другими видами лечения.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, могут быть пригодны для предупреждения, лечения или контроля заболевания или патологического состояния, связанного с инфекцией, вызываемой *Staphylococcus aureus*, в том числе, но не ограничиваясь этим, дермонекроза, инфекций кожи и мягких тканей (в том числе абсцессов), инфекций в месте хирургического вмешательства, инфекций эндопротезов суставов, бактериемии, септицемии, септического артрита, менингита, остеомиелита, эндокардита, пневмонии, синдрома токсического шока, мастита, фурункулеза и карбункулеза (фурункулов).

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как нативный полноразмерный гемолизин A (SEQ ID NO: 291), или модифицированная форма гемолизина A (SEQ ID NO: 295), или фрагменты гемолизина A, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногеном активным фрагментом гемолизина A.

Иммуноген может представлять собой иммуногенный фрагмент гемолизина A или ДНК, кодирующую его фрагмент. Иммуноген может представлять собой гемолизин A, связанный с гистиридиновым тэгом и/или фрагментом Fc-области антитела.

Аминокислотная последовательность полноразмерного гемолизина A показана в виде SEQ ID NO: 291. Полноразмерная аминокислотная последовательность модифицированного гемолизина A показана в виде SEQ ID NO: 295.

В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связываются с гемолизином A, могут быть получены с использованием фрагментов вышеупомянутых областей или пептидов, которые располагаются за пределами обозначенных областей на около 5-20 аминокислотных остатков от одного или обоих N- или C-терминальных концов областей, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления любая комбинация вышеуказанных областей или их фрагментов может быть использована при получении антител, специфичных к гемолизиному A. В определенных вариантах осуществления любая одна или несколько из вышеуказанных областей гемолизина A или его фрагментов может быть использована для получения моносpezifических, бисpezifических или мультисpezifических антител.

Антигенсвязывающие фрагменты антител.

Если специально не указано иное, термин "антитело", используемый в настоящем документе, следует понимать как таковой, который включает в себя молекулы антител, содержащих две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. "полноразмерные молекулы антител"), а также их антигенсвязывающие фрагменты.

Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в настоящем документе, включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса.

Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемые в настоящем документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с гемолизином A. Фрагмент антитела может включать в себя Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут происходить, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генетической инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе,

например, библиотеки фаговых антител) или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя:

- (i) Fab-фрагменты;
- (ii) F(ab')₂-фрагменты;
- (iii) Fd-фрагменты;
- (iv) Fv-фрагменты;
- (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv);
- (vi) dAb-фрагменты и
- (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4.

Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-антитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка низкомолекулярного размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H-домен, ассоциированный с V_L-доменом, V_H- и V_L-домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L-домен.

В определенных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут встречаться в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают в себя:

- (i) V_H-C_H1;
- (ii) V_H-C_H2;
- (iii) V_H-C_H3;
- (iv) V_H-C_H1-C_H2;
- (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;
- (vi) V_H-C_H2-C_H3;
- (vii) V_H-C_L;
- (viii) V_L-C_H1;
- (ix) V_L-C_H2;
- (x) V_L-C_H3;
- (xi) V_L-C_H1-C_H2;
- (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;
- (xiii) V_L-C_H2-C_H3 и
- (xiv) V_L-C_L.

В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны с помощью полноразмерной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H- или V_L-доменами (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны с помощью полноразмерной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H- или V_L-доменами (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет в типичном случае

содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифических антител, в том числе форматы иллюстративных биспецифических антител, раскрытых в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных методик, доступных в настоящей области техники.

Настоящее изобретение включает в себя антигемолизин А антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие цепи иммуноглобулина, которые содержат аминокислотные последовательности, изложенные в настоящем документе, а также варианты, имеющие клеточные и/или посттрансляционные модификации *in vitro*. Например, настоящее изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемолизином А, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, изложенные в настоящем документе (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3), а также антитела и фрагменты, в которых один или несколько аминокислотных остатков гликозилированы, один или несколько остатков Asp деамидированы, один или несколько остатков (например, Met, Trp и/или His) окислены, N-концевой Gln представляет собой пироглутамат (пироЕ) и/или C-концевой лизин отсутствует.

Настоящее изобретение включает в себя рекомбинантные способы получения антигемолизин А антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению или их иммуноглобулиновой цепи, включающие в себя (i) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих легкую и/или тяжелую цепь иммуноглобулина указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, тяжелую цепь или его V_H, или иммуноглобулин, содержащий его HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или легкую цепь или его V_L, или иммуноглобулин, содержащий его LCDR1, LCDR2 и LCDR3), например, при этом полинуклеотид находится в векторе и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (например, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки *Pichia* или клетки *Pichia pastoris*) при условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида(ов); и (iii) необязательно, выделение антитела или его фрагмента или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивают клетку-хозяина. При создании антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего более одной иммуноглобулиновой цепи, например антитела, которое содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина, коэкспрессия цепей в одной клетке-хозяине приводит к ассоциации цепей, например, в клетке или на поверхности клетки или вне клетки, если такие цепи секретируются таким образом, чтобы образовать молекулу антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы включают в себя таковые, в которых экспрессируется только тяжелая цепь иммуноглобулина или только легкая цепь иммуноглобулина (например, любая из описанных в настоящем документе, в том числе зрелые фрагменты и/или их вариабельные домены). Такие цепи пригодны, например, в качестве посредников при экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который содержит такую цепь. Настоящее изобретение включает в себя продукты таких способов экспрессии (например, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, V_H или V_L).

Получение человеческих антител.

Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны в настоящей области техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для создания человеческих антител, которые специфически связываются с гемолизином А.

С использованием технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител высокоаффинные химерные антитела к гемолизину А изначально выделяют с человеческой вариабельной областью и мышинной константной областью. Технология VELOCIMMUNE® включает в себя создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие вариабельные области тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, таким образом, что мышь продуцирует антитело, содержащее человеческую вариабельную область и мышинную константную область в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь VELOCIMMUNE® подвергают воздействию антигена, представляющего интерес, а из мышей, которые экспрессируют антитела, извлекают лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки могут быть слиты с клеточной линией миеломы для получения бессмертных линий гибридных клеток, и такие линии гибридных клеток подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий гибридных клеток, которые продуцируют антитела, специфические к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующая вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с необходимыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть продуцирован в клетке, такой как клетка CHO. В альтернативном варианте ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или ва-

риабельные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Изначально выделены высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и отбирают в отношении необходимых характеристик, в том числе аффинности, селективности, эпитопа и т.п. Мышинные константные области заменяют необходимой человеческой константной областью для получения полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Несмотря на то, что выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, вариабельная область обеспечивает высокоаффинные антигенсвязывающие и специфические в отношении мишени характеристики.

Как правило, антитела по настоящему изобретению обладают очень высокими аффинностями, в типичном случае имея значения K_D от около 10^{-12} до около 10^{-7} М, при измерении по связыванию с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе или в фазе раствора. Мышинные константные области заменяют необходимыми человеческими константными областями для получения полностью человеческого антитела по настоящему изобретению. Несмотря на то, что выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, вариабельная область обеспечивает высокоаффинные антигенсвязывающие и специфические в отношении мишени характеристики.

Биоэквиваленты.

Антигемолизин А антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению включают в себя белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых раскрытых антител, но которые сохраняют способность связывать гемолизин А. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по сути эквивалентна таковой описанных антител. Аналогичным образом, кодирующие антитела последовательности ДНК по настоящему изобретению включают в себя последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, однако таковые кодируют антитело или фрагмент антитела, который по сути является биоэквивалентным антителу или фрагменту антитела по настоящему изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, например, если они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень всасывания которых не демонстрируют значимой разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в однократной дозе, так и многократных дозах. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени своего всасывания, но не по скорости своего всасывания, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости всасывания являются целенаправленными и отражаются в маркировке, являются не существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются с медицинской точки зрения незначимыми для определенного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности по сравнению с непрерывной терапией без такого переключения.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают в себя, например, (a) исследование *in vivo* у человека или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в качестве функции времени; (b) исследование *in vitro*, которое коррелировало и достоверно прогнозирует настоящие биодоступности у человека *in vivo*; (c) исследование *in vivo* у человека или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в виде функции времени; и (d) строго контролируемое клиническое исследование, в котором устанавливают безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по настоящему изобретению могут быть сконструированы, например, с помощью осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не являются существенными для биологической активности, могут быть удалены или замещены другими аминокислотами, с целью преду-

преждения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Антигемолизин А антитела, содержащие Fc-варианты.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антигемолизин А антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает в себя антигемолизин А антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом настоящая(ие) мутация(и) увеличивает(ют) аффинность Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, в которой значение pH колеблется от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких Fc-модификаций включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, 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 включает в себя 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). В еще одном варианте осуществления модификация включает в себя модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает в себя антигемолизин А антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A) и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в вариабельных доменах антитела, раскрытые в настоящем документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает в себя антигемолизин А антитела, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), при этом химерная область C_H содержит сегменты, происходящие из областей C_H от более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2, происходящий из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в сочетании с частью или со всем доменом C_H3, происходящим из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерную область C_H, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки из положений от 216 до 227 в соответствии с нумерацией по ЕС), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в сочетании с последовательностью "нижнего шарнира" (аминокислотные остатки из положений от 228 до 236 в соответствии с нумерацией по ЕС), происходящей из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H, описанную в настоящем документе, в определенных вариантах осуществления может демонстрировать модифицированные эффекторные Fc-функции без отрицательного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г., раскрытие которой тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Настоящее изобретение также включает в себя антигемолизин А антитела, содержащие модифицированные константные области тяжелой цепи (C_H), в которые были введены одна или несколько замен (например, мутаций), которые препятствуют связыванию белка А. Например, в некоторых вариантах осуществления антигемолизин А антитела по настоящему изобретению имеют константные области IgG1, в которых His435 мутировал в Arg. С этой точечной мутацией в константных областях тяжелой цепи антигемолизин А антитело по настоящему изобретению не будет связываться с белком А. В других вариантах осуществления настоящего изобретения антигемолизин А антитела содержат дипептидную мутацию, H435R/Y436F (по нумерации ЕС; H95R/Y96F по IMGT) в константных областях тяжелой цепи для устранения связывания с белком А. (См., например, патент США № 8586713, поданный

25 июня 2010 г., раскрытие которого тем самым включено посредством ссылки в полном объеме).

Биологические характеристики антител.

Как правило, антитела по настоящему изобретению могут функционировать в результате связывания с гемолизином А. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут связываться с другим антигеном (перекрестно-реактивные антитела).

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут связываться с другими бактериальными токсинами или субъединицами токсина, в дополнение к гемолизину А. Дополнительные токсины или субъединицы токсина *S.aureus*, с которыми могут связываться антитела по настоящему изобретению, включают в себя двухкомпонентные порообразующие лейкотоксины (например, лейкоцидины или гамма-гемолизин) и/или S- или F-субъединицы этих токсинов (например, LukF, LukD и/или HlgB). В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению демонстрируют только значительное связывание с гемолизином А. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются детектируемым образом только с гемолизином А.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой биспецифические антитела. Биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать один эпитоп в одном домене, а также могут связывать один эпитоп во втором домене гемолизина А. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать два различных эпитопа в одном и том же домене.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено полностью человеческое моноклональное антитело или его фрагмент, который связывается с гемолизином А, при этом антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько из следующих характеристик:

(i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262 и 282, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность;

(ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250 и 270, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность;

(iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 188, 208, 228, 248, 268 и 288, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256 и 276, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность;

(iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 184, 204, 224, 244, 264 и 284, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 186, 206, 226, 246, 266 и 286, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252 и 272, или по сути аналогичной ей последовательности, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 194, 214, 234, 254 и 274, или по сути аналогичную ей последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательность; и (v) связывается с гемолизином А со значением K_D , равным или менее 10^{-7} .

Определенные антигемолизин А антитела по настоящему изобретению способны связывать и нейтрализовать активность гемолизина А, как определено в анализах *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по настоящему изобретению связываться и нейтрализовать активность гемолизина А может быть измерена с помощью любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области техники, в том числе анализов связывания или анализов активности, описанных в настоящем документе.

Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примерах 3 и 4 в настоящем документе. В примере 6 аффинности связывания и кинетические константы человеческих антигемолизин А антител определяли с помощью поверхностного плаз-

монного резонанса и измерения проводили на приборе T200 Bioscore. В примере 5 описывают нейтрализацию гемолизина *A. S. aureus* с помощью специфических в отношении гемолизина А антител.

Настоящее изобретение также включает в себя антигемолизин А антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются по меньшей мере с одним биологически активным фрагментом любого из следующих белков или пептидов: SEQ ID NO: 291 (полноразмерный гемолизин А дикого типа) или SEQ ID NO: 295 (модифицированная форма гемолизина А). Любой из пептидов гемолизина А, описанных в настоящем документе, или их фрагменты, могут быть использованы для получения антигемолизин А антител.

Пептиды могут быть модифицированы с включением добавления или замены определенных остатков для мечения или для целей конъюгации с молекулами-носителями, такими как KLH. Например, цистеин может быть добавлен как на N-терминальном, так и на C-терминальном конце пептида или может быть добавлена линкерная последовательность с получением пептида для конъюгации, например, с KLH в целях иммунизации.

Антитела, специфические к гемолину А, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляют собой биотин. В анализе связывания положение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида по отношению к поверхности, на которой связывают пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет находиться дистально по отношению к поверхности. В одном варианте осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, детектируемую с помощью MPT. В определенных вариантах осуществления такие меченые антитела могут быть использованы в диагностических анализах, в том числе анализах визуализации.

Картирование эпитопов и связанные с этим технологии.

Настоящее изобретение включает в себя антигемолизин А антитела, которые взаимодействуют с одной или несколькими областями гемолизина А. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, находящихся в упомянутых выше областях гемолизина А (например, линейный эпитоп в домене). В альтернативном варианте эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в одном или обеих упомянутых выше областях молекулы гемолизина А (например, конформационный эпитоп).

Различные методики, известные специалистам в настоящей области техники, могут быть использованы для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами" в полипептиде или белке. Иллюстративные методики включают в себя, например, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие как описанные в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают в себя аланин-сканирующий мутационный анализ, пептидный блот-анализ (Reineke (2004), Methods Mol. Biol. 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и NMR-анализ. Кроме того, могут быть использованы такие способы, как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000), Protein Science, 9:487-496). Другим способом, который может быть применен для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водород-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ на основе водород-дейтериевого обмена включает в себя мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антитела, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с более медленной скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью области контакта. В результате этого аминокислоты, которые являются частью области контакта белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, проявлять относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в область контакта. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и анализу с помощью масс-спектрометрии, тем самым выявляя пептиды, содержащие меченные дейтерием остатки, которые содержат конкретные аминокислоты, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999), Analytical Biochemistry, 267(2):252-259; Engen and Smith (2001), Anal. Chem. 73:256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым реагируют В- и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут образовываться как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, соединенных в результате третичного фолдинга белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, в типичном случае сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные в результате третичного фолдинга, в типичном случае утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп в типичном случае содержит по меньшей мере 3 и еще чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование на основе модификаций (MAP), также известное как профилирование на основе структуры антигенов (ASAP), представляет собой способ, который классифицирует большие количества моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, на основании сходства профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигенов (см. патент США № 2004/0101920, особым образом включенный в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, явно отличающийся от эпитопа, представленного другой категорией, или частично перекрывающийся с таким эпитопом. Настоящая технология позволяет быстро фильтровать генетически идентичные антитела таким образом, что можно сосредоточить характеристику на генетически различных антителах. При применении для скрининга гибридом MAP может обеспечить идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют mAb, имеющие необходимые характеристики. MAP может быть использовано для сортировки антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающих различные эпитопы.

В определенных вариантах осуществления антигемолизин А антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в любом одном или нескольких областях, приведенных в качестве примера в гемолизине А дикого типа, как приведено в качестве примера в SEQ ID NO: 291, или модифицированном гемолизине А, как приведено в качестве примера в SEQ ID NO: 295, или его фрагменте.

Настоящее изобретение включает в себя человеческие антигемолизин А антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе, или антител, имеющих последовательности CDR из любых из иллюстративных антител, описанных в настоящем документе. Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает в себя антигемолизин А антитела, которые конкурируют за связывание с гемолизином А или фрагментом гемолизина А с любым из приведенных в качестве примера конкретных антител, описанных в настоящем документе, или антителом, содержащим последовательности CDR из любых из иллюстративных антител, описанные в настоящем документе.

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антигемолизин А антитело, или конкурирует за связывание с ним с помощью стандартных способов, известных в настоящей области техники. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антигемолизин А антитело по настоящему изобретению, эталонное антитело связывают с белком или пептидом гемолизином А в условиях насыщения. Затем определяют способность исследуемого антитела связываться с молекулой гемолизина А. Если исследуемое антитело способно связываться с гемолизином А после насыщающего связывания с эталонным антигемолизин А антителом, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антигемолизин А антитело. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с белком гемолизином А после насыщающего связывания с эталонным антигемолизин А антителом, то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антигемолизин А антителом по настоящему изобретению.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антигемолизин А антителом, описанную выше методику связывания выполняют в двух направлениях: в первом направлении эталонное антитело связывают с белком гемолизином А в условиях насыщения, за которым следует определение связывания исследуемого антитела с молекулой гемолизина А. Во втором направлении исследуемое антитело связывают с молекулой гемолизина А в условиях насыщения с последующим определением связывания эталонного антитела с молекулой гемолизина А. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой гемолизина А, то делают вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с гемолизином А. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может необязательно связываться с идентичным эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела с помощью связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Два антитела связываются с тем же самым или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Иными словами, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже на 99%, измеренное с помощью анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990, 50:1495-1502). В альтернативном варианте два антитела имеют тот же самый эпитоп, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы в случае, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем может быть проведен дополнительный стандартный эксперимент (например, анализ пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, связано ли фактически наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела со связыванием с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, или отвечает ли стерическое блокирование (или другое явление) за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа могут быть выполнены с помощью ИФА, РИА (радиоиммунологическо-

го анализа), поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в настоящей области техники.

Иммуноконъюгаты.

Настоящее изобретение включает в себя антигемолизин А моноклональное антитело, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как агент, который способен ослаблять тяжесть инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, или нормализовать по меньшей мере один симптом, ассоциированный с инфекцией, вызываемой *S. aureus*, или его тяжесть. Используемый в настоящем документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином или терапевтическим агентом. Антитело может быть связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином или терапевтическим агентом в любом положении вдоль молекулы до тех пор, пока она способна связывать свою мишень. Примером иммуноконъюгата является конъюгат антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой второе отличное антитело к гемолизу А, или цитокин, такой как ИЛ-1, ИЛ-6, или хемокин, такой как TGF- β . Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антигемолизином А антителом, будет учитывать патологическое состояние, подлежащее лечению, и необходимый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники; см., например, WO 05/103081. Получение иммуноконъюгатов и иммунотоксинов, как правило, хорошо известно в настоящей области техники (см., например, патент США № 4340535). Иммуноконъюгаты подробно описаны, например, в патентах США № 7250492, 7420040 и 7411046, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме.

Мультиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела по настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связан (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, в целях получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, настоящее изобретение включает в себя биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении N-концевой области гемолизина А или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении C-концевой области гемолизина А или второго терапевтического фрагмента, или конъюгировано с терапевтическим фрагментом. Иллюстративный формат биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, включает в себя применение первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, при этом первый и второй домены C_{H3} отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом разница по меньшей мере в одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, лишенным разницы в аминокислоте. В одном варианте осуществления первый домен C_{H3} Ig связывается с белком А, а второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов по IMGT, H435R - нумерация по EC). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F - по EU). Дополнительные модификации, которые могут встречаться во втором C_{H3} , включают в себя: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EC) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (по IMGT; N384S, K392N и V422I по EC) в случае антител IgG2 и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EC) в случае антител IgG4. Вариации в формате биспецифического антитела, описанные выше, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифичные форматы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают в себя, но не ограничиваясь ими, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеупомянутых форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с помощью конъюгации пептидов и нуклеиновых кислот, например, при этом не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реактивностью используются для создания сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем подверга-

ются самосборке в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы.

В настоящем изобретении предложены терапевтические композиции, содержащие антигемолизин А антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут производить введение, целевого заболевания, патологических состояний, пути введения и т.п. В случае, если антитело по настоящему изобретению используют для предупреждения или лечения дермонекроза, инфекций кожи и мягких тканей (в том числе абсцессов), инфекций в месте хирургического вмешательства, инфекций эндопротезных суставов, бактериемии, сепсиса, септического артрита, менингита, остеомиелита, эндокардита, пневмонии, синдрома токсического шока, мастита или фурункулеза и карбункулеза (фурункулов) у взрослого пациента или для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой *S.aureus*, предпочтительно вводить внутривенно антитело по настоящему изобретению, как правило, в виде однократной дозы от около 0,1 до около 100 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 5 до около 100, от около 10 до около 90 или от около 20 до около 70 мг/кг массы тела. В зависимости от степени тяжести патологического состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы по меньшей мере от около 0,1 до около 800 мг, от около 1 до около 500 мг, от около 5 до около 300 мг или от около 10 до около 200 мг, до около 100 мг или до около 50 мг. В некоторых вариантах осуществления начальная доза может сопровождаться введением второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть приблизительно таким же или менее, чем начальная доза, при этом последующие дозы разделены по меньшей мере от 1 до 3 дней; по меньшей мере 1 неделей, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями или по меньшей мере 14 неделями.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы 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 в себя, но не ограничиваясь ими, внутрикожные, трансдермальные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композиция может быть введена с помощью любого удобного пути, например с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкого кишечника и т.п.), а также может быть введена совместно с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в везикуле, в частности липосоме (см., например, Langer (1990), Science, 249:1527-1533).

В настоящем документе также предусмотрено применение наночастиц для доставки антител по настоящему изобретению. Конъюгированные с антителом наночастицы могут быть использованы как для терапевтических, так и для диагностических применений. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы их получения и применения подробно описаны Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" в J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящий документ посредством ссылки. Наночастицы для доставки лекарственного средства также описаны, например, в патентах США № 8277812, 8258256, 8257740, 8246995, 8236330, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления может быть использован насос. В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система контролируемого высвобождения может быть расположена вблизи мишени композиции, таким образом, при этом требуется лишь доля системной дозы.

Инъекционные формы могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.п. Эти инъекционные формы могут быть получены с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные формы, могут быть получены, например, с помощью растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.п., которые могут быть использованы в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.п. В качестве маслянистой среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.п., которые могут быть использованы в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Инъекцию, полученную таким образом, предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки шприц-ручка легко находит применение при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке, как правило, используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Непосредственно после того, как всю фармацевтическую композицию в картридже вводят и картридж становится пустым, пустой картридж можно сразу выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка может быть повторно использована. В одноразовой шприц-ручке сменный картридж отсутствует. Предпочтительно одноразовая шприц-ручка приходит заполненной фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри изделия. Непосредственно после того, как резервуар освобождают от фармацевтической композиции, все изделие выбрасывают.

Многочисленные многоразовые шприц-ручки и шприц-тюбики находят применения при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают в себя, но определенно не ограничиваясь ими, 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 Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых шприц-ручек, которые используются при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваясь ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Таязанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и это лишь некоторые из них.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в лекарственных формах в однократной дозе, подходящей для соответствия дозе действующих веществ. Такие лекарственные формы в однократной дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.п. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в однократной дозе; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм. Настоящее изобретение включает в себя инъекционное изделие (например, предварительно заполненный шприц или предварительно заполненный шприц-тюбик) или флакон (например, стеклянный или пластиковый флакон), содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению или его фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Терапевтические применения антител.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению могут быть пригодными для лечения инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть пригодны для лечения патологического состояния или симптома дермонекроза, инфекций кожи и мягких тканей (в том числе абсцессов), инфекций в месте хирургического вмешательства, инфекций эндопротезных суставов, бактериемии, септицемии, септического артрита, менингита, остеомиелита, эндокардита, пневмонии, синдрома токсического шока, мастита или фурункулеза и карбункулеза (фурункулов). Антитела по настоящему изобретению также предусмотрены для

профилактического применения у пациентов с риском развития инфекции, вызываемой *S.aureus*. Эти пациенты включают в себя лиц пожилого возраста, или пациентов с ослабленным иммунитетом вследствие болезни или лечения иммунодепрессантами, или пациентов, которые имеют высокий риск нозокомиальных инфекций, таких как пациенты в послеоперационном периоде. В различных вариантах осуществления терапевтических применений, описанных выше, бактерии *S.aureus* могут быть резистентными в отношении одного или нескольких типов лечения антибиотиками. В одном варианте осуществления бактерии представляют собой резистентные к метициллину *S.aureus* (MRSA). Предполагается, что антитела по настоящему изобретению могут быть использованы в отдельности или в сочетании со вторым агентом или третьим агентом для лечения инфекции, вызываемой *S.aureus*, или для облегчения по крайней мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*. Вторые или третьи агенты могут быть доставлены одновременно с антителами по настоящему изобретению или могут быть введены раздельно, до или после антител по настоящему изобретению. Пациент, который может получать антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению или его фармацевтическую композицию, включает в себя, например, животное, такое как млекопитающее, такое как человек (например, пожилой человек, например, в возрасте 65 лет или старше), кролик, мышь, крыса, корова, свинья, собака, примат, лошадь или овца.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению пригодны для снижения количества бактерий *Staphylococcus aureus* в индивидууме или определенной ткани или органе индивидуума. В некоторых вариантах осуществления бактерии *S.aureus* могут быть резистентными к одному или нескольким типам лечения антибиотиками. В одном варианте осуществления бактерии являются резистентными к метициллину *S.aureus* (MRSA). В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению пригодны для снижения токсических активностей гемолизина А, продуцируемого бактериями *Staphylococcus aureus*, у индивидуума, в результате уменьшения симптомов, вызываемых инфекцией, и обеспечения контроля инфекции другими фармацевтическими агентами и/или иммунной системой пациента.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению используют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, или симптома, ассоциированного с инфекцией, вызываемой *S.aureus*.

Комбинированные виды терапии.

Комбинированные виды терапии могут включать в себя антигемолизин А антитело по настоящему изобретению и любой(ые) дополнительный(ые) терапевтический(ие) агент(ы), который(ые) может(гут) быть предпочтительно объединен(ы) с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению.

Антитела могут быть использованы в сочетании с другими видами терапии, такими как антибиотики, НСПВС, антитело LTM14, антитело LC10, кортикостероиды или преднизон.

Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(компоненты) может(гут) быть введен(ы) до, одновременно или после введения антигемолизин А антитела по настоящему изобретению. Для целей настоящего раскрытия такими режимами введения считаются введение антигемолизин А антитела "в сочетании с" одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами.

Диагностические применения антител.

Антигемолизин А антитела по настоящему изобретению также могут быть использованы для выявления и/или измерения гемолизина А в образце, например, для диагностических целей. Предполагается, что любое одно или несколько антител по настоящему изобретению могут быть использованы для выявления наличия и тяжести инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*. Иллюстративные диагностические анализы в отношении гемолизина А могут включать в себя, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антигемолизин А антителом по настоящему изобретению, при этом антигемолизин А антитело метят детектируемой меткой или репортерной молекулой или используют в качестве иммобилизованного лиганда для селективного выделения гемолизина А из образцов пациентов. В альтернативном варианте немеченное антигемолизин А антитело может быть использовано в диагностических применениях в сочетании с вторичным антителом, которое само по себе является детектируемым образом меченым. Детектируемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, 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 могут быть использованы для выявления или измерения гемолизина А в образце, включают в себя иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (РИА) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах гемолизина А в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит детектируемые количества гемолизина А или его фрагментов в нормальных

или патологических условиях. Как правило, уровни гемолизина А в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного *Staphylococcus aureus*), будут измерены для первоначального установления начального или стандартного уровня гемолизина А. Этот начальный уровень гемолизина А затем может быть сравнен с уровнями гемолизина А, измеренными в образцах, полученных от лиц с подозрением на наличие патологического состояния, связанного с инфекцией, вызываемой *S. aureus*, или симптомов, ассоциированных с таким патологическим состоянием.

Антитела, специфические в отношении к гемолизу А, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляют собой биотин. В анализе связывания положение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида по отношению к поверхности, на которой связывают пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет находиться дистально по отношению к поверхности. В некоторых вариантах осуществления метка может представлять собой детектируемую метку, такую как радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, детектируемую с помощью МРТ. Детектируемые метки могут быть связаны с антителами, при этом такие антитела могут быть использованы в анализах визуализации.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в настоящей области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не предусмотрены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Получение человеческих антител к гемолизу А.

Для иммунизации мышей использовали два иммуногена: полноразмерный гемолизин А дикого типа (H1a) без сигнальной последовательности (аминокислоты 27-391) и полноразмерный нетоксикогенный гемолизин А (H1a-H35L); оба представляли собой рекомбинантные меченные His белки, экспрессируемые в *E. coli* и очищенные.

В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связываются с гемолизином А, могут быть получены с использованием фрагментов вышеупомянутых областей или пептидов, которые располагаются за пределами обозначенных областей на около 5-20 аминокислотных остатков от одного или обоих N- или C-терминальных концов областей, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления любая комбинация вышеуказанных областей или их фрагментов может быть использована при получении антител, специфических в отношении гемолизина А. В определенных вариантах осуществления любой один или несколько из указанных выше доменов гемолизина А или его фрагментов может быть использован для получения моносpezifических, бисpezifических или мультисpezifических антител. H1H15375P, H1H15376P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P и H1H15418P2 получали путем иммунизации нетоксикогенным гемолизином А; а H1H15381P, H1H15399P, H1H15404P, H1H15405P, H1H15408P, H1H15410P, H1H15414P и H1H15420P2 получали в результате иммунизации гемолизином А дикого типа.

Полноразмерные белки или их фрагменты, которые использовали в качестве иммуногенов, как отмечено выше, вводили непосредственно с адьювантом для стимуляции иммунного ответа мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи человеческого иммуноглобулина. Иммунный ответ антитела наблюдали с помощью иммунологического анализа, специфического в отношении гемолизина А. В случае, если необходимого иммунного ответа достигали, антигемолизин А антитела выделяли непосредственно из антиген-позитивных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 2007/0280945 A1, особым образом включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. С помощью этого способа получали полностью человеческие антигемолизин А антитела (т.е. антитела, обладающие человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами); иллюстративные антитела, полученные таким образом, обозначали следующим образом: H1H15375P, H1H15376P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15404P, H1H15405P, H1H15408P, H1H15410P, H1H15414P, H1H15418P2 и H1H15420P2.

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

Пример 2. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 изложены пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, специфических в отношении гемолизина А и их соответствующие идентификаторы антител. Антитела в типичном случае обозначают в настоящем документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H4H", "H1M" или "H2M"), за которым следует числовой идентификатор (например, "9559", "5375" или "9629", как показано в табл. 1), за которым следует суффикс "R" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой антитело может называться, например,

"H1N5375". Префиксы H4N, H1M и H2M в обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывают на определенный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H2M" имеет Fc IgG2 мыши, в то время антитело "H4N" имеет Fc IgG4 человека. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, антитело H1M или H2M может быть превращено в антитело H4N, и наоборот, но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые указаны с помощью числовых идентификаторов, показанных в табл. 1, останутся прежними. Антитела, имеющие одинаковое числовое обозначение антитела, но отличающиеся буквенным суффиксом N, B или P, относятся к антителам, имеющим тяжелые и легкие цепи с идентичными последовательностями CDR, но с вариациями последовательностей в областях, которые выходят за пределы последовательностей CDR (т.е. в каркасных областях). Таким образом, варианты N, B и P определенного антитела имеют идентичные последовательности CDR в своих переменных областях тяжелой и легкой цепей, но отличаются друг от друга в своих каркасных областях.

Таблица 1

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1N15375P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1N15376P	22	24	26	28	30	32	34	36
H1N15377P	42	44	46	48	50	52	54	56
H1N15378P	62	64	66	68	70	72	74	76
H1N15379P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1N15380P	102	104	106	108	110	112	114	116
H1N15381P	122	124	126	128	130	132	134	136
H1N15399P	142	144	146	148	150	152	154	156
H1N15404P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1N15405P	182	184	186	188	190	192	194	196
H1N15408P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1N15410P	222	224	226	228	230	232	234	236
H1N15414P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1N15418P2	262	264	266	268	270	272	274	276
H1N15420P2	282	284	286	288	270	272	274	276

Пример 3. Связывание человеческих моноклональных антител с токсином гемолизином A *S.aureus*.

В целях определения того, способны ли антитела по настоящему изобретению связываться с мономером гемолизина A, очищенные антитела (H1N15375P, H1N15376P, H1N15377P, H1N15378P, H1N15379P, H1N15380P, H1N15381P, H1N15399P, H1N15404P, H1N15405P, H1N15408P, H1N15410P, H1N15414P, H1N15418P2 и H1N15420P2) исследовали с помощью ИФА. Микротитрационные планшеты MaxiSorp покрывали в течение ночи 10 мкг/мл очищенного гемолизина A *S.aureus* на лунку. Титры антител по настоящему изобретению и изотипически сходного контрольного антитела (в диапазоне от 50 мкМ до 1 пМ с последовательными разведениями 1:3) добавляли в лунки, содержащие токсин, и инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Лунки промывали три раза и затем инкубировали с 100 нг/мл конъюгированного с HRP вторичного античеловеческое антитело антитела на лунку в течение 1 ч при 25°C. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл хемилюминесцентного субстрата SuperSignal ELISA (ThermoFisher Scientific) и выявляли сигнал (планшет-ридер Victor X3, Perkin Elmer). Значения люминесценции анализировали с помощью трехпараметрического логистического уравнения на кривой отклика из 12 точек (GraphPad Prism).

Наблюдали связывание антигемолизина A антител в субнаномолярном диапазоне EC₅₀ в случае связывания с токсином гемолизином A *S.aureus*. (табл. 2 и фиг. 1).

Таблица 2

Связывание антигемолизина А mAb с гемолизином А *S.aureus*

AbPID	EC ₅₀ [M] в случае связывания
	гемолизина А
H1H15375P	3,94E-10
H1H15376P	3,13E-10
H1H15377P	2,92E-10
H1H15378P	2,48E-10
H1H15379P	3,24E-10
H1H15380P	3,45E-10
H1H15381P	2,85E-10
H1H15399P	3,12E-10
H1H15404P	3,02E-10
H1H15405P	5,25E-10
H1H15408P	3,56E-10
H1H15410P	3,21E-10
H1H15414P	5,40E-10
H1H15418P2	3,58E-10
H1H15420P2	3,11E-10
Изотипический контроль	С.о.

С.о.: связывание отсутствует.

Пример 4. Связывание человеческих mAb с гемолизином А *S.aureus* до двухкомпонентных токсинов.

Штаммы *S.aureus* могут продуцировать дополнительные порообразующие токсины, лейкоцидины и гамма-гемолизин (Hlg), которые также требуют олигомеризации для образования функциональных пор. В отличие от гемолизина А, лейкоцидины и Hlg представляют собой двухкомпонентные токсины, состоящие из двух субъединиц: S-субъединицы и F-субъединицы. В настоящее время идентифицированы пять S-субъединиц (LukA, LukE, LukS-PV, HlgA и HlgC) и четыре F-субъединицы (LukB, LukD, LukF-PV и HlgB), в результате чего образуются пять функциональных токсинов (LukAB, LukED, PVL, HlgAB и HlgCB). В то время как между S- и F-субъединицами и гемолизином А наблюдается низкая идентичность последовательности (Aman M.J. and Adhikaari R.P., (2014), Toxins. 6:950-972), все компоненты демонстрируют структурную гомологию с гемолизином А.

В целях определения того, способны ли антигемолизин А антитела по настоящему изобретению перекрестно связываться с другими токсинами, очищенные антитела (H1H15375P, H1H15376P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15404P, H1H15405P, H1H15408P, H1H15410P, H1H15414P, H1H15418P2 и H1H15420P2) исследовали на перекрестную реактивность в отношении двухкомпонентных токсинов *S.aureus* с помощью ИФА. Микротитрационные планшеты MaxiSorp покрывали в течение ночи 10 мкг/мл отдельных F-компонентов двухкомпонентных токсинов *S.aureus* на лунку. Компоненты рекомбинантных токсинов получали из IBT BioServices (Гейтерсберг, Мэриленд) или создавали с помощью GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси). Титры антител по настоящему изобретению и изотипически сходного контрольного антитела (в диапазоне от 50 мкМ до 100 пМ с последовательными разведениями 1:3) добавляли в лунки, содержащие токсин, и инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Лунки промывали 3 раза и затем инкубировали с 100 нг/мл конъюгированного с HRP вторичного античеловеческого антитела антитела на лунку в течение 1 ч при 25°C. 100 мкл хемилюминесцентного субстрата SuperSignal ELISA Pico (ThermoFisher Scientific) добавляли в лунки и выявляли сигнал (планшет-ридер Victor X3, Perkin Elmer). Значения люминесценции анализировали с помощью трехпараметрического логистического уравнения на кривой отклика из 11 точек (GraphPad Prism). Изотипически сходное нерелевантное контрольное антитело и дельта-токсин *S.aureus* включали в качестве контролей.

Исследование 15 антител по настоящему изобретению на перекрестную реактивность в отношении к двухкомпонентным токсинам показало одно mAb, H1H15381P, которое проявляло связывание с F-компонентами LukF, LukD и HlgB, хотя и с 2-log или 3-log меньшей аффинностью, чем таковая, наблюдаемая в случае гемолизина А (табл. 3 и фиг. 2a-2c). При исследовании H1H15381P на перекрестную реактивность в отношении к S-компонентам LukS, LukE, HlgA и HlgC аффинности связывания были значимо ниже по сравнению со связыванием с F-компонентами (фиг. 3a-3c). Связывание H1H15381P является специфическим в отношении гемолизина А и двухкомпонентных токсинов, поскольку не было показано связывания с дельта-токсином *S.aureus*. Изотипически сходное контрольное антитело не продемонстрировало какого-либо связывания с компонентами двухкомпонентного токсина.

Таблица 3

Связывание антигемолизина А mAb с двухкомпонентными токсинами *S.aureus* (только F-компонентом)

AbPID	LukF (GS)	EC ₅₀ [M] в случае связывания двухкомпонентного токсина			<i>S.aureus</i> Дельта- токсин
		LukF (IBT)	LukD (GS)	HlgB (GS)	
H1N15375P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15376P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15377P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15378P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15379P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15380P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15381P	6,67E-08	1,65E-07	5,96E-08	1,021E-07	С.о.
H1N15399P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15404P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15405P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15408P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15410P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15414P	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15418P2	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
H1N15420P2	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.
Изотипический контроль	С.о.	–	С.о.	С.о.	С.о.

GS, GenScript; IBT, IBT BioServices;

С.о.: связывание отсутствует;

–: не исследовано.

Пример 5. Нейтрализация гемолизина А *S.aureus* в анализе цитотоксичности с использованием ТНР-1.

Способность очищенных mAb предупреждать лизис, опосредованный гемолизином А, исследовали с использованием клеточной линии моноцитов человека, ТНР-1. В общей сложности $2,5 \times 10^5$ клеток ТНР-1 в RPMI (с добавлением 1% инактивированной нагреванием FBS, L-глутамина и заменимых аминокислот) высевали в 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном, обработанные культурой ткани, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 5% CO₂. Титры очищенных антител (H1N15375P, H1N15376P, H1N15377P, H1N15378P, H1N15379P, H1N15380P, H1N15381P, H1N15399P, H1N15404P, H1N15405P, H1N15408P, H1N15410P, H1N15414P, H1N15418P2 и H1N15420P2) или изотипически сходного контрольного антитела (в диапазоне от 10 до 0 мкМ с последовательными разведениями 1:3 в среде) инкубировали с 10 нМ очищенного гемолизина А в 96-луночном планшете в течение 30 мин при 25°C на шейкере перед добавлением к высеянным клеткам. Титр очищенного гемолизина А (1,5-0 мкМ с разведениями 1:3) без антитела также инкубировали с клетками в отдельности.

Затем клетки с токсином и антителом или токсином в отдельности инкубировали в течение 3 ч (37°C, 5% CO₂) и измеряли гибель клеток с использованием набора для анализа CytoTox-Glo (Promega). Люминесценцию выявляли с использованием планшет-ридера (Victor X3, Perkin Elmer). Все антитела по настоящему изобретению проявляли сходные нейтрализующие активности против гемолизина А, в то время как изотипически сходное антитело не проявляло никакой нейтрализующей активности против гемолизина А, см. табл. 4.

Таблица 4

Нейтрализация гемолизина A *S.aureus* в анализе цитотоксичности
с использованием ТНР-1

AbPID	IC ₅₀ [M] в случае нейтрализации гемолизина А
H1H15375P	3,96E-09
H1H15376P	7,45E-09
H1H15377P	1,76E-09
H1H15378P	10,7E-09
H1H15379P	6,95E-09
H1H15380P	7,84E-09
H1H15381P	4,21E-09
H1H15399P	1,31E-09
H1H15404P	6,31E-09
H1H15405P	5,37E-09
H1H15408P	6,41E-09
H1H15410P	5,89E-09
H1H15414P	1,72E-09
H1H15418P2	2,47E-09
H1H15420P2	4,14E-09

Пример 6. Нейтрализация гемолизина A *S.aureus* в культуральных супернатантах с использованием анализа гемолиза эритроцитов кролика.

Эффективность нейтрализации гемолизина А очищенными mAb с использованием культуральных супернатантов *S.aureus* определяли с использованием эритроцитов кролика (rRBC). Культуральные супернатанты получали с помощью инкубирования штаммов *S.aureus* (Американская коллекция типовых культур, Манассас, Вирджиния) в TSB в течение 16 ч при 37°C (при встряхивании), удаления бактерий в результате центрифугирования и фильтрации среды, содержащей токсин. Титры очищенного антитела H1H15399P или изотипически сходного контрольного антитела (в диапазоне от 10 до 0 мкМ с последовательными разведениями 1:2 в 1× PBS) инкубировали со стерильно отфильтрованными культуральными супернатантами *S.aureus* (что приводило бы к ≥80% лизису клеток) в 96-луночном планшете в течение 30 мин при 25°C на шейкере. После 30-минутной инкубации 100 мкл смесей культуральный супернатант:mAb добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты, содержащие 100 мкл 4% rRBC (Colorado Serum Company, Денвер, Колорадо) в 1× PBS. После 1 ч инкубации при 37°C планшеты центрифугировали в течение 5 мин, 100 мкл супернатанта осторожно удаляли на новый микротитрационный планшет и люминесценции считывали с использованием планшет-ридера (SpectraMax i3x, Molecular Devices). Все антитела по настоящему изобретению проявляли аналогичные нейтрализующие активности против гемолизина А, в то время как изотипически сходное антитело не проявляло никакой нейтрализующей активности против гемолизина А, см. табл. 5.

Таблица 5

**Ингибирование нативного гемолизина A *S.aureus* с помощью
антигемолизин A mAb H1H15399**

Обозначение штамма <i>S.aureus</i>	Тип PFGE	IC ₅₀ [M] в случае связывания гемолизина А
GA201	USA100	6,697e-10
MRSA252	USA200	Ингибирование отсутствует*
CA-127	USA300	2,339e-09
TCH1516	USA300	4,047e-09
MW2	USA400	Ингибирование отсутствует
GA229	USA500	6,725e-10
00:50	USA600	Ингибирование отсутствует
8:03	USA700	7,091e-10
27-05	USA800	1,274e-09
94:1013	USA1000	5,434e-09
7031	USA1100	8,279e-10

*MRSA252 содержит стоп-кодон в своей последовательности гемолизина А, в результате чего белок гемолизин А не секретируется.

Пример 7. Аффинности связывания и кинетические константы человеческих антигемолизин А моноклональных антител в соответствии с Biacore.

Константы скорости ассоциации и скорости диссоциации (k_a и k_d соответственно), константы равновесной диссоциации и диссоциационные периоды полужизни (K_D и $t_{1/2}$ соответственно) в случае гемолизина А дикого типа и мутантного (H1a-H35L) гемолизина А, связывающегося с очищенными антигемолизин А антителами, определяли с использованием биосенсорного анализа поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени на приборе Biacore T200. Поверхность сенсора Biacore дериватизировали моноклональным мышинным анти-Fc человека антителом (BR-1008-39, GE Healthcare) для захвата примерно 150-360 RU антигемолизин А моноклональных антител, экспрессируемых с Fc человека. Различные концентрации токсинов гемолизина А в диапазоне от 100 до 1,56 нМ инъецировали на поверхность, захваченную антигемолизин А моноклональным антителом при скорости потока 50 мкл/мин на Biacore T200. Связывание токсинов гемолизина А с захваченными моноклональными антителами при 25 и 37°C контролировали в течение 4 мин, а диссоциацию от антител контролировали в течение 10 мин с помощью HBS-ET (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20) в качестве рабочего буфера.

Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли с помощью обработки и подгонки настоящих к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для подгонки кривых Scrubber 2.0с. Затем константы связывания при равновесии диссоциации (K_D) и диссоциационные периоды полужизни ($t_{1/2}$) затем рассчитывали исходя из кинетических констант скорости в виде: K_D (М) = k_d/k_a и $t_{1/2}$ (мин) = $[\ln 2/(60 \cdot k_d)]$.

Параметры кинетики связывания в случае связывания гемолизина А дикого типа и мутантного гемолизина А с различными антигемолизин А моноклональными антителами при 25 и 37°C приведены в табл. 6-9.

Как показано в табл. 6, при 25°C все антигемолизин А антитела по настоящему изобретению связывались с гемолизином А дикого типа со значениями K_D в диапазоне от 171 пМ до 26,2 нМ.

Как показано в табл. 7, при 37°C все антигемолизин А антитела по настоящему изобретению связывались с гемолизином А со значениями K_D в диапазоне от 260 пМ до 76,3 нМ.

Как показано в табл. 8, при 25°C все антигемолизин А антитела по настоящему изобретению связывались с мутантным гемолизином А со значениями K_D в диапазоне от 52,3 пМ до 8,89 нМ.

Как показано в табл. 9, при 37°C все антигемолизин А антитела по настоящему изобретению связывались с мутантным гемолизином А со значениями K_D в диапазоне от 74,7 пМ до 18,7 нМ.

Таблица 6

Параметры кинетики связывания антигемолизин А
моноклональных антител, связывающихся с гемолизином А
дикого типа при 25°C

	25° С			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
PID Ab	(л/моль * с)	(1/с)	[М]	(мин)
H1H15420P2	7,67E+05	1,31E-04	1,71E-10	88
H1H15414P	3,62E+05	1,15E-04	3,18E-10	100
H1H15399P	3,59E+05	1,15E-04	3,22E-10	100
H1H15405P	7,76E+04	6,69E-05	8,62E-10	173
H1H15418P2	1,20E+05	1,02E-04	8,49E-10	113
H1H15377P	3,09E+05	3,15E-04	1,02E-09	37
H1H15380P	4,99E+05	4,43E-04	8,88E-10	26
H1H15375P	6,00E+04	1,27E-04	2,12E-09	91
H1H15381P	7,81E+05	1,50E-03	1,92E-09	8
H1H15404P	8,36E+04	3,37E-04	4,02E-09	34
H1H15408P	1,09E+05	8,32E-04	7,62E-09	14
H1H15410P	5,62E+04	4,62E-04	8,22E-09	25
H1H15376P	1,33E+05	2,18E-03	1,64E-08	5
H1H15378P	3,01E+05	7,88E-03	2,62E-08	1,5
H1H15379P	2,43E+05	6,34E-03	2,61E-08	1,8

Таблица 7

Параметры кинетики связывания антигемолизин А
моноклональных антител, связывающихся с гемолизином А
дикого типа при 37°C

	25° С			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
PID Ab	(л/моль * с)	(1/с)	[М]	(мин)
H1H15420P2	1,18E+06	3,07E-04	2,60E-10	38
H1H15414P	5,57E+05	3,13E-04	5,62E-10	37
H1H15399P	4,90E+05	3,22E-04	6,57E-10	36
H1H15405P	1,17E+05	1,76E-04	1,51E-09	65
H1H15418P2	1,78E+05	3,50E-04	1,96E-09	33
H1H15377P	4,81E+05	1,08E-03	2,25E-09	11
H1H15380P	6,49E+05	1,48E-03	2,28E-09	8
H1H15375P	9,40E+04	4,28E-04	4,56E-09	27
H1H15381P	9,32E+05	6,50E-03	6,97E-09	1,8
H1H15404P	1,18E+05	2,07E-03	1,75E-08	6
H1H15408P	1,48E+05	4,05E-03	2,73E-08	2,9
H1H15410P	8,68E+04	2,51E-03	2,89E-08	5
H1H15376P	1,70E+05	8,42E-03	4,96E-08	1,4
H1H15378P	4,21E+05	2,29E-02	5,45E-08	0,5
H1H15379P	3,04E+05	2,32E-02	7,63E-08	0,5

Таблица 8

Параметры кинетики связывания антигемолизин А
моноклональных антител, связывающихся
с мутантным гемолизином А при 25°C

	25° C			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
PID Ab	(л/моль * с)	(1/с)	[М]	(мин)
H1H15420P2	2,28E+06	1,19E-04	5,23E-11	97
H1H15414P	С.о.	С.о.	С.о.	С.о.
H1H15399P	9,98E+05	1,00E-04	1,00E-10	116
H1H15405P	2,46E+05	5,82E-05	2,37E-10	199
H1H15418P2	3,96E+05	7,43E-05	1,88E-10	155
H1H15377P	1,12E+06	4,11E-04	3,67E-10	28
H1H15380P	1,39E+06	3,87E-04	2,79E-10	30
H1H15375P	1,76E+05	1,17E-04	6,65E-10	99
H1H15381P	2,26E+06	1,22E-03	5,40E-10	9
H1H15404P	2,68E+05	2,94E-04	1,10E-09	39
H1H15408P	3,47E+05	7,05E-04	2,03E-09	16
H1H15410P	1,52E+05	3,99E-04	2,63E-09	29
H1H15376P	4,22E+05	1,45E-03	3,43E-09	8
H1H15378P	7,66E+05	6,81E-03	8,89E-09	1,7
H1H15379P	6,81E+05	4,43E-03	6,51E-09	2,6

*С.о. означает, что в экспериментальных условиях токсин гемолизин А не связывался с захваченным антигемолизин А моноклональным антителом.

Таблица 9

Параметры кинетики связывания антигемолизин А
моноклональных антител, связывающихся с мутантным
гемолизином А при 37°C

	25° C			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
PID Ab	(л/моль * с)	(1/с)	[М]	(мин)
H1H15420P2	3,56E+06	2,66E-04	7,47E-11	43
H1H15414P	С.о.	С.о.	С.о.	С.о.
H1H15399P	1,42E+06	2,78E-04	1,96E-10	42
H1H15405P	4,30E+05	1,52E-04	3,54E-10	76
H1H15418P2	5,68E+05	2,29E-04	4,03E-10	51
H1H15377P	1,59E+06	1,37E-03	8,64E-10	8
H1H15380P	1,88E+06	1,31E-03	6,95E-10	9
H1H15375P	3,11E+05	3,70E-04	1,19E-09	31
H1H15381P	2,45E+06	4,66E-03	1,90E-09	2,5
H1H15404P	3,35E+05	1,81E-03	5,41E-09	6
H1H15408P	4,38E+05	2,93E-03	6,68E-09	4
H1H15410P	2,26E+05	2,19E-03	9,72E-09	5
H1H15376P	4,73E+05	4,41E-03	9,32E-09	2,6
H1H15378P	9,43E+05	1,68E-02	1,78E-08	0,7
H1H15379P	6,41E+05	1,20E-02	1,87E-08	1

*С.о. означает, что в экспериментальных условиях токсин гемолизин А не связывался с захваченным антигемолизин А моноклональным антителом.

Пример 8. Механизм блокирующей активности антигемолизин А mAb.

В целях определения того, выполняют ли антигемолизин А mAb свою функцию в результате блокирования взаимодействия токсина со своим специфическим рецептором, активность металлопротеазы, ассоциированной с клеткой-хозяином, ADAM10, измеряли с помощью анализа флуорогенного пептидного субстрата с использованием клеток A549, инкубированных с гемолизином А. Титры антигемолизин А mAb (H1H15377P, H1H15381P и H1H15399P) предварительно инкубировали с 3 нМ очищенного гемоли-

зина А в течение 15 мин при 37°C перед добавлением в 96-луночные планшеты, содержащие $2,5 \times 10^4$ клеток A549 в среде F-12К Хэма (с добавлением 10% термоинактивированной FBS и L-глутамина). После инкубации в течение 60 мин при 37°C добавляли 5 мкМ флуорогенного пептидного субстрата (MCA-PLAVQ-DPA-R $\geq$ R-NH₂, R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), инкубировали в течение 15 мин при 37°C и интенсивность флуоресценции считывали с использованием планшет-ридера (фильтр возбуждения 320 нм и эмиссионный фильтр 405 нм, SpectraMax i3x, Molecular Devices) и выражали в виде относительных единиц флуоресценции. Антитела по настоящему изобретению блокировали индуцированное токсином повышение активности ADAM10, в то время как изотипически сходное антитело не оказывало какого-либо влияния на индуцируемую токсином повышенную активность ADAM10 (фиг. 4а). Это указывало на то, что антитела по настоящему изобретению блокировали взаимодействие гемолизина А со своим рецептором.

Для дальнейшей демонстрации того, что антигемолизин А mAb предупреждали связывание токсина с мембраной клетки-хозяина, эксперименты по связыванию с мембраной проводили в присутствии антигемолизин А mAb с использованием эритроцитов кролика (rRBC), а ассоциацию токсина с мембраной rRBC выявляли с помощью вестерн-блоттинга. Чтобы избежать лизиса rRBC, эксперименты по связыванию проводили при 4°C. Титры антигемолизин А mAb (H1H15377P и H1H15399P) предварительно инкубировали с 10 нМ гемолизина А в течение 15 мин при 37°C перед добавлением к промытым rRBC (10% в 250 мкл PBS) и инкубировали в течение 60 мин при 4°C. rRBC осаждали, супернатант удаляли и клетки лизировали с помощью трех циклов ресуспендирования в 1 мл ddH₂O, инкубации в течение 10 мин при 25°C и центрифугирования при 16100×g. Мембраны солюбилизировали в 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100 и 1% дезоксихолата натрия. Солюбилизированные образцы восстанавливали, кипятили и разделяли на 4-12% геле для SDS-PAGE (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), переносили на мембрану PVDF (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), а мономер гемолизина А выявляли с помощью pAb (IBT BioServices, Роквилл, Мэриленд). Антитела по настоящему изобретению предупреждали связывание гемолизина А с мембраной rRBC, в то время как изотипически сходное антитело не проявляло никакого эффекта (фиг. 4b).

Пример 9. Эффективность *in vivo* человеческих антигемолизин А mAb, вводимых профилактически в мышиную модель дермонекроза

С целью определения того, способны ли антигемолизин А mAb по настоящему изобретению уменьшать или предупреждать поражения кожи, вызванные *S.aureus*, очищенные антитела исследовали профилактически в модели дермонекроза *in vivo* с использованием самок мышей BALB/c (n=3-5) (Bubeck Wardenburg et al., (2008), J. Infect. Dis. 198:1166-1170). За два дня до инфицирования шерсть удаляли из области живота с помощью бритвы и нанесения лосьона для удаления волос. За один день до инфицирования мышам вводили внутривентрально с левой стороны живота однократную дозу 5 или 0,5 мг/кг каждого отдельного антитела: H1H15375P, H1H15376P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15404P, H1H15405P, H1H15408P, H1H15410P, H1H15414P, H1H15418P2, H1H15420P2 или изотипически сходного контрольного антитела. В день инфицирования мышам подкожно вводили с правой стороны живота 50 мкл *S.aureus* CA-127 ($\sim 1-2 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы (OD₆₀₀ - 1) в TSB при 37°C, промывали и суспендировали в PBS. Поражения у мышей измеряли с помощью цифрового штангенциркуля на 2-е сутки после инфицирования.

Все антитела по настоящему изобретению были эффективны в обеих исследуемых дозах. При введении в дозе 5 мг/кг все антитела показали аналогичную эффективность, снижая дермонекротические поражения на 80-90% по сравнению с изотипически сходным контрольным антителом (табл. 10). Аналогичным образом, при введении животным в дозе 0,5 мг/кг все антитела по настоящему изобретению (за исключением H1H15410P) демонстрировали уменьшение размера поражения по сравнению с таковыми, которые получали изотипически сходное антитело (табл. 10). В то же время уменьшение размера поражения варьировалось от 40 до 80%, при этом H1H15410P не проявляло эффекта в этой дозе. Антитела H1H15380P, H1H15381P, H1H15405P и H1H15414P были наиболее эффективными при введении в дозе 0,5 мг/кг, при уменьшении размеров поражения на >80%. Сравнение групп 5 и 0,5 мг/кг показало дозозависимый эффект: мыши, получавшие антитела в дозе 5 мг/кг, имели меньшие поражения по сравнению с мышами, получавшими то же самое антитело в дозе 0,5 мг/кг.

Таблица 10

Сравнение размера поражения в случае антигемолизин А
моноклональных антител в профилактической мышинной модели
дермонекроза, 2-е сутки после инфицирования

Мыши, получавшие 5 мг/кг mAb и инфицированные $1,3 \times 10^8$ КОЕ <i>S.aureus</i> CA-127					Мыши, получавшие 0,5 мг/кг mAb и инфицированные $1,5 \times 10^8$ КОЕ <i>S.aureus</i> CA-127			
AbPID	Мыши (n)	Уменьшение по отношению к изотипу (%)	Средний размер поражения (мм)	SD	Мыши (n)	Уменьшение по отношению к изотипу (%)	Средний размер поражения (мм)	SD
H1N15375 P	5	90,7	31,6	6,3	5	68,0	63,2	29,2
H1N15376 P	5	89,2	37,0	7,2	5	79,9	39,8	9,4
H1N15377 P	5	85,7	48,8	7,0	5	57,5	84,1	70,1
H1N15378 P	5	88,4	39,5	9,9	5	67,1	65,0	30,4
H1N15379 P	5	88,5	39,1	13,3	5	76,9	45,6	39,9
H1N15380 P	5	87,1	44,2	8,0	5	82,1	35,4	23,5
H1N15381 P	5	83,9	55,1	22,2	5	85,1	29,5	26,0
H1N15399 P	5	89,0	37,7	13,4	5	69,9	59,6	18,3
H1N15404 P	5	86,7	45,5	12,5	5	46,6	105,7	40,5
H1N15405 P	5	92,1	27,0	7,1	5	86,4	26,9	11,1
H1N15408 P	5	90,1	33,9	10,4	5	73,1	53,3	17,2
H1N15410 P	5	86,5	46,2	9,8	4	0,0	216,8	98,1
H1N15414 P	5	90,2	33,5	17,5	5	82,1	35,5	12,5
H1N15418 P2	5	86,6	45,8	6,7	5	48,9	101,1	63,1
H1N15420 P2	5	85,8	48,5	7,9	5	62,2	74,7	37,5
Изотипич. контроль	3	0,0	341,6	38,6	5	0,0	197,8	56,8

Для дальнейшего изучения способности антигемолизин А mAb уменьшать размер поражения mAb вводили профилактически в трех разных дозах и сравнивали с двумя другими антигемолизин А mAb, LTM14 (см., например, патент США № 8715673 - SEQ ID NO: 1 и 2 или Foletti et al., Mechanism of Action and In Vivo Efficacy of a Human-Derived Antibody against Staphylococcus α -Hemolysin, J. Mol. Biol. 425:1641-1654 (2013)) и LC10 (см., например, WO 2012/109285 - SEQ ID NO: 57 и 58). Шерсть удаляли у самок мышей BALB/c, как описано выше, за два дня до инфицирования. За один день до инфицирования

мышам ($n=5$ на группу) вводили внутривенно с левой стороны живота однократную дозу 5, 0,5 или 0,125 мг/кг каждого отдельного антитела: H1H15377P, H1H15381P, H1H15399P, LTM14, LC10 или изотипически сходного контрольного антитела. В день инфицирования мышам подкожно вводили с правой стороны живота 50 мкл *S.aureus* CA-127 (штамм MRSA; $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мышь) или *S.aureus* Newman (штамм MSSA; $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и суспендировали в PBS. Поражения у мышей измеряли с помощью цифрового штангенциркуля на 2-е сутки после инфицирования.

Все антитела по настоящему изобретению были эффективны во всех трех исследуемых дозах с использованием штаммов MRSA и MSSA *S.aureus*. При введении в дозе 5 мг/кг все антитела, в том числе LC10 и LTM14, показывали аналогичную эффективность как против *S.aureus* CA-127 (фиг. 5a), так и против Newman (фиг. 6a), уменьшая поражения на 85% по сравнению с изотипически сходным контрольным антителом. Аналогичным образом, при введении мышам в дозе 0,5 мг/кг все антитела показывали аналогичное снижение размера поражений на 50-60% по сравнению с таковыми, которые получали изотипически сходное антитело (фиг. 5b и 6b). В то же время, уменьшение размера поражения было более значительным при использовании H1H15377P и H1H15399P по сравнению с H1H15381P, LC10 и LTM14 при введении в дозе 0,125 мг/кг с использованием как *S.aureus* CA-127 (фиг. 5c), так и Newman (фиг. 6c), находясь в диапазоне 30-40% по сравнению с таковыми, обработанными изотипически сходным антителом. В случае всех антител сравнение групп 5 мг/кг, 0,5 мг/кг и 0,125 мг/кг показывало дозозависимый эффект: мыши, получавшие антитела в более высоких концентрациях, имели меньшие поражения (поражения в дозе 5 мг/кг < поражений в дозе 0,5 мг/кг < поражений в дозе 0,125 мг/кг).

Пример 10. Содержание бактерий в коже мышей, которым вводили антигемолизин A mAbs профилактически.

Три очищенных антитела по настоящему изобретению, H1H15377P, H1H15381P и H1H15399P, исследовали в модели дермонекроза с целью определения того, наблюдались ли какие-либо заметные изменения бактериальной нагрузки в коже мышей, профилактически обработанных антителами. Антитела по настоящему изобретению также сравнивали с двумя другими антигемолизин A mAb, LC10 и LTM14. За два дня до инфицирования шерсть удаляли с области живота у самок мышей BALB/c с помощью бритвы и нанесения лосьона для удаления волос. За один день до инфицирования мышам вводили внутривенно с левой стороны живота однократную дозу 5 мг/кг каждого отдельного антитела: H1H15377P, H1H15381P и H1H15399P, LTM14, LC10 или контрольного антитела, соответствующего изотипу. В день инфицирования мышам ($n=5$ на группу) подкожно вводили с правой стороны живота 50 мкл *S.aureus* CA-127 (штамм MRSA; $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мышь) или Newman (штамм MSSA; $2,9 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и суспендировали в PBS. Мышей подвергали эвтаназии в результате анестезии через 2 суток после инфицирования, область поражения (и окружающую кожу) иссекали с помощью 8 мм иглы для биопсии кожи и гомогенизировали. Последовательные разведения лизатов кожи высевали на планшеты с TSA. Планшеты инкубировали в течение ночи (16-18 ч) при 37°C и на следующий день подсчитывали бактериальные колонии для определения бактериальной нагрузки.

Антитела H1H15377P и H1H15399P снижали бактериальную нагрузку в коже мышей, инфицированных как *S.aureus* CA-127 (фиг. 7a), так и Newman (фиг. 7b); в частности, доза 5 мг/кг любого антитела приводила к 1-1,5 log уменьшению бактериальной нагрузки в коже по сравнению с уровнями бактериальной нагрузки, определенными в случае животных, обработанных изотипически сходным контрольным антителом. Та же самая доза H1H15381P, LTM14 или LC10 привела к 0-0,5 log снижению бактериальной нагрузки в коже. Результаты показывают, что H1H15377P и H1H15399P были наиболее эффективными в снижении бактериальной нагрузки в коже инфицированных мышей.

Пример 11. Эффективность *in vivo* антигемолизин A mAb, вводимых терапевтически.

С целью определения того, способны ли mAb по настоящему изобретению также уменьшать размер поражения кожи при введении после инфицирования, очищенные антитела исследовали терапевтически в модели дермонекроза *in vivo* с использованием самок мышей BALB/c ($n=5$). За два дня до инфицирования шерсть удаляли из области живота с помощью бритвы и нанесения лосьона для удаления волос. В день инфицирования мышам подкожно вводили с правой стороны живота 50 мкл *S.aureus* CA-127 ($\sim 1-2 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Через 2 ч после инфицирования мышам вводили внутривенно с левой стороны живота однократную дозу 0,5 мг/кг каждого отдельного антитела: H1H15375P, H1H15376P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15404P, H1H15405P, H1H15408P, H1H15410P, H1H15414P, H1H15418P2, H1H15420P2 или изотипически сходного контрольного антитела. Поражения у мышей измеряли с помощью цифрового штангенциркуля на 2-е сутки после инфицирования.

Все антитела по настоящему изобретению были эффективны в уменьшении размера поражения при введении животным в дозе 0,5 мг/кг через 2 ч после инфицирования (табл. 11).

Уменьшение размеров дермонекротических поражений находилось в диапазоне 50-83%. Восемь ан-

тител (Н1Н15376Р, Н1Н15377Р, Н1Н15378Р, Н1Н15379Р, Н1Н15380Р, Н1Н15399Р, Н1Н15418Р2 и Н1Н15420Р2) показывали >70% уменьшение размеров поражений.

Таблица 11

Сравнение размера поражения в случае антигемолизин А
моноклональных антител в терапевтической мышинной модели
дермонекроза, 2-е сутки после инфицирования

AbPID	Мыши, получавшие 0,5 мг/кг mAb и инфицированные $1,1 \times 10^8$ КОЕ <i>S.aureus</i> CA-127			
	Мыши (n)	Уменьшение по отношению к изотипу (%)	Средний размер поражения (мм)	SD
Н1Н15375Р	5	69,2	52,8	44,9
Н1Н15376Р	5	79,4	35,4	11,4
Н1Н15377Р	5	73,1	46,2	35,0
Н1Н15378Р	5	82,8	29,6	8,3
Н1Н15379Р	5	74,5	43,8	19,4
Н1Н15380Р	5	79,5	35,2	15,8
Н1Н15381Р	5	59,0	70,5	53,2
Н1Н15399Р	4	73,2	46,1	15,4
Н1Н15404Р	5	56,2	75,3	24,4
Н1Н15405Р	5	69,8	51,9	19,1
Н1Н15408Р	5	63,9	62,1	21,3
Н1Н15410Р	5	50,2	85,5	38,1
Н1Н15414Р	5	80,9	32,8	12,9
Н1Н15418Р2	5	70,6	50,4	11,2
Н1Н15420Р2	5	73,7	45,2	30,1
Изотипический контроль	5	0,0	171,8	97,9

Пример 12. Эффективность *in vivo* антигемолизин А mAb в модели острой пневмонии с использованием восприимчивого к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Выживаемость мышей, которым вводили антитела в дозе 5 мг/кг профилактически.

С целью определения эффективности mAb против штамма MSSA при введении профилактически, следующие антитела Н1Н15375Р, Н1Н15376Р, Н1Н15377Р, Н1Н15378Р, Н1Н15379Р, Н1Н15380Р, Н1Н15381Р, Н1Н15399Р и Н1Н15414Р отбирали для исследования в модели острой пневмонии с использованием *S.aureus* Newman (модифицированной Bubeck Wardenburg et al., (2007), Infect. Immun. 75:1040-1044). Самкам мышей C57BL/6 (n=5) внутрибрюшинно вводили однократную дозу 5 мг/кг Н1Н15375Р, Н1Н15376Р, Н1Н15377Р, Н1Н15378Р, Н1Н15379Р, Н1Н15380Р, Н1Н15381Р, Н1Н15399Р, Н1Н15414Р или изотипически сходного антитела. Через один день после введения mAb мышам вводили интратрахеально 50 мкл *S.aureus* Newman ($1,7 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Мышей контролировали в отношении выживаемости в течение 6 суток после инфицирования.

Как видно из табл. 12, введение антител Н1Н15375Р, Н1Н15376Р, Н1Н15378Р, Н1Н15379Р, Н1Н15380Р, Н1Н15381Р, Н1Н15399Р или Н1Н15414Р приводило к 100% выживаемости. Введение Н1Н15377Р приводило к 80% выживаемости к 6-м суткам. Все антитела по настоящему изобретению повышали выживаемость мышей, инфицированных штаммом *S.aureus* MSSA, при введении профилактически в дозе 5 мг/кг в модели инфекции с острой пневмонией.

Таблица 12

Выживаемость мышей, которым вводили 5 мг/кг антигемолизин А
моноклональных антител профилактически в модели
острой пневмонии с использованием штамма MSSA

AbPID	<i>S. aureus</i> Newman (MSSA) доза mAb: 5 мг/кг	
	Мыши N	Выживаемость на С6 после инфицирования %
H1H15375P	5	100
H1H15376P	5	100
H1H15377P	5	80
H1H15378P	5	100
H1H15379P	5	100
H1H15380P	5	100
H1H15381P	5	100
H1H15399P	5	100
H1H15414P	5	100
Изотипический контроль	5	20

Выживаемость мышей, которым вводили антитела в дозе 2,5 мг/кг профилактически.

С целью определения того, будут ли антитела также эффективны в более низкой дозе в модели острой пневмонии против штамма MSSA, самкам мышей C57BL/6 (n=5) вводили внутривенно однократную дозу 2,5 мг/кг H1H15375P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15414P или изотипически сходное антитело. Через один день после введения mAb мышам вводили интратрахеально 50 мкл *S. aureus* Newman ($7,5 \times 10^7$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Мышей контролировали в отношении выживаемости в течение шести суток после инфицирования.

Как видно из табл. 12, введение антител H1H15376P, H1H15377P, H1H15379P, H1H15381P, H1H15399P или H1H15414P приводило к 100% выживаемости к 6-м суткам, в то время как введение антител H1H15378P или H1H15380P приводило к 80% выживаемости. Антитело H1H15375P было менее эффективным по сравнению с другими антителами, обеспечивая только 60% защиту (табл. 13).

Результаты показывают, что антитела H1H15375P, H1H15376P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15414P и H1H15377P являются эффективными в снижении цитотоксических эффектов гемолизина А и повышении выживаемости в мышинной модели острой пневмонии с использованием штамма *S. aureus*, даже в случае введения mAb в более низкой дозе.

Таблица 13

Выживаемость мышей, которым вводили 2,5 мг/кг антигемолизин А
моноклональных антител профилактически в модели
острой пневмонии с использованием штамма MSSA

AbPID	<i>S. aureus</i> Newman (MSSA) доза mAb: 2,5 мг/кг	
	Мыши N	Выживаемость на С6 после инфицирования %
H1H15375P	5	60
H1H15376P	5	100
H1H15377P	5	100
H1H15378P	5	80
H1H15379P	5	100
H1H15380P	5	80
H1H15381P	5	100
H1H15399P	5	100
H1H15414P	5	100
Изотипический контроль	5	0

Пример 13. Эффективность *in vivo* антигемолизина А mAb в модели острой пневмонии с использованием резистентного к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Выживаемость мышей, которым вводили антитела в дозе 5 мг/кг профилактически.

С целью исследования эффективности mAb против штамма MRSA следующие антитела H1N15375P, H1N15376P, H1N15377P, H1N15378P, H1N15379P, H1N15380P, H1N15381P, H1N15399P и H1N15414P отбирали для исследования в профилактической модели острой пневмонии с использованием *S.aureus* CA-127. Самкам мышей C57BL/6 ($n=5$) внутрибрюшинно вводили однократную дозу 5 мг/кг H1N15375P, H1N15376P, H1N15377P, H1N15378P, H1N15379P, H1N15380P, H1N15381P, H1N15399P, H1N15414P или изотипически сходного антитела. Через один день после введения mAb мышам вводили интритрахеально 50 мкл, содержащих $2,2 \times 10^8$ КОЕ (инокулят с низким содержанием) или $4,8 \times 10^8$ КОЕ (инокулят с высоким содержанием) *S.aureus* CA-127, которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Мышей контролировали в отношении выживаемости в течение 6 суток после инфицирования.

Восемь из девяти антител по настоящему изобретению показывали эффективность при введении мышам инокулята с низким содержанием. В частности, антитела H1N15375P, H1N15377P, H1N15378P, H1N15379P, H1N15380P, H1N15381P и H1N15399P были одинаково эффективными, приводя к 100% выживаемости к 6-м суткам (табл. 14). Введение H1N15414P приводило к 80% выживаемости. H1N15376P не продемонстрировало никакой защиты, поскольку мыши, получавшие это антитело, не выживали к 6-м суткам. Ни одно из животных, обработанных изотипически сходным антителом, не выживало к 6-м суткам (табл. 13).

При инокуляте с более высоким содержанием наблюдали большую разницу в эффективности между антителами по настоящему изобретению. Как видно из табл. 13, антитела H1N15377P и H1N15399P были наиболее эффективными из исследуемых антител, приводя к 100% выживаемости к 6-м суткам. Введение антител H1N15414P, H1N15378P, H1N15379P и H1N15381P приводило к 60% выживаемости к 6-м суткам, в то время как ни одно из животных в группе, обработанной изотипически сходным контрольным антителом, не выживало к 6-м суткам. Антитела H1N15375P, H1N15376P и H1N15380P имели более низкую эффективность, чем другие исследуемые антитела по настоящему изобретению, приводя к 20, 0 или 40% выживаемости к 6-м суткам соответственно (табл. 13).

Результаты свидетельствуют о том, что H1N15375P, H1N15377P, H1N15378P, H1N15379P, H1N15380P, H1N15381P, H1N15399P и H1N15414P являются эффективными в снижении цитотоксических эффектов гемолизина А и повышении выживаемости при введении профилактически в дозе 5 мг/кг в модели инфекции с острой пневмонией в случае инокулята с менее высоким содержанием штамма *S.aureus* MRSA. Два антитела, H1N15377P и H1N15399P, также были эффективны на 100% в случае использования в этой модели инокулята с более высоким содержанием штамма *S.aureus* MRSA.

Таблица 14

Выживаемость мышей, которым вводили 5 мг/кг антигемолизина А моноклональных антител профилактически в модели острой пневмонии с использованием штамма MRSA

	<i>S.aureus</i> CA-127 (MRSA) доза mAb: 5 мг/кг	Инокулят с низким содержанием ($2,2 \times 10^8$ КОЕ)	Инокулят с высоким содержанием ($4,8 \times 10^8$ КОЕ)
AbPID	Мыши N	Выживаемость %	Выживаемость %
H1N15375P	5	100	20
H1N15376P	5	0	0
H1N15377P	5	100	100
H1N15378P	5	100	60
H1N15379P	5	100	60
H1N15380P	5	100	40
H1N15381P	5	100	60
H1N15399P	5	100	100
H1N15414P	5	80	60
Изотипический контроль	5	0	0

Выживаемость мышей, которым вводили антитела в дозе 2,5 мг/кг профилактически. С целью определения того, будут ли антитела также эффективны в более низкой дозе в модели острой пневмонии

против штамма MRSA, самкам C57BL/6 (n=5) вводили внутривенно однократную дозу 2,5 мг/кг H1H15375P, H1H15376P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P, H1H15414P или изотипически сходное антитело. Через один день после введения mAb мышам вводили интратрахеально 50 мкл *S.aureus* CA-127 ($3,0 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Мышей контролировали в отношении выживаемости в течение шести суток после инфицирования.

Все исследуемые антитела по настоящему изобретению (H1H15375P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P или H1H15414P) были одинаково эффективными, приводя к 100% выживаемости к 6-м суткам, в то время как ни одно из контрольных животных в группе, обработанной изотипически сходным контрольным антителом, не выживало к 6-м суткам (табл. 15). Результаты свидетельствуют о том, что H1H15375P, H1H15377P, H1H15378P, H1H15379P, H1H15380P, H1H15381P, H1H15399P и H1H15414P являются эффективными в снижении цитотоксических эффектов гемолизина А и повышении выживаемости при введении профилактически в дозе 2.5 мг/кг в модели инфекции с острой пневмонией с использованием штамма *S.aureus* MRSA.

Таблица 15

Выживаемость мышей, которым вводили 2,5 мг/кг антигемолизина А
моноклональных антител профилактически в модели
острой пневмонии с использованием штамма MRSA

AbPID	<i>S.aureus</i> CA-127 (MRSA) доза mAb: 2,5 мг/кг	
	Мыши N	Выживаемость на С6 после инфицирования %
H1H15375P	5	100
H1H15377P	5	100
H1H15378P	5	100
H1H15379P	5	100
H1H15380P	5	100
H1H15381P	5	100
H1H15399P	5	100
H1H15414P	5	100
Изотипический контроль	5	0

Содержание бактерии в легких мышей, которым вводили H1H15399P и H1H15376P профилактически.

Два очищенных антитела по настоящему изобретению, H1H15399P и H1H15376P, исследовали в модели острой пневмонии с целью определения того, наблюдались ли какие-либо заметные изменения бактериальной нагрузки в легких мышей, профилактически обработанных антителами. Группам самок мышей C57BL/6 (n=5) внутривенно вводили одну из трех доз H1H15399P, однократную дозу H1H15375P или изотипически сходное антитело (5 мг/кг). Через один день после введения мышам вводили интратрахеально 50 мкл *S.aureus* CA-127 ($1,6 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Мышей подвергали эвтаназии в результате анестезии через 18 ч после инфицирования, а легкие извлекали и гомогенизировали. Последовательные разведения лизатов легких высевали на планшеты с TSA. Планшеты инкубировали в течение ночи (16-18 ч) при 37°C и на следующий день подсчитывали бактериальные колонии для определения бактериальной нагрузки.

Антитело H1H15399P снижало бактериальную нагрузку в легких инфицированных мышей (табл. 16); в частности, все три дозы исследуемого H1H15399P приводили к 1-1,5 log уменьшению бактериальной нагрузки в легких по сравнению с уровнями бактериальной нагрузки, определенными в случае животных, обработанных изотипически сходным контрольным антителом. Кроме того, это снижение бактериальной нагрузки в легких было дозозависимым. Антитело H1H15376P не проявляло какой-либо эффективности в этой модели, показывая бактериальную нагрузку в легких, аналогичную изотипически сходному антителу. Результаты показывают, что H1H15399P было способно снижать бактериальную нагрузку в легких инфицированных мышей.

Таблица 16

Содержание бактерий в легких мышей, которым вводили антигемолизин А моноклональные антитела Н1Н15399Р и Н1Н15376Р профилактически в модели острой пневмонии с использованием штамма MRSA

AbPID	Мыши (n)	Доза (мг/кг)	Нагрузка на орган	
			Среднее КОЕ/легкое	SD
Н1Н15399Р	5	5	5,50Е+06	2,30Е+06
	5	2,5	1,11Е+07	1,10Е+07
	5	1,25	1,04Е+07	7,06Е+06
Н1Н15376Р	5	5	1,47Е+08	2,33Е+08
Изотипический контроль	4	5	2,45Е+08	1,72Е+08

С целью дальнейшего изучения способности антигемолизин А mAb снижать бактериальную нагрузку в легких три mAb (Н1Н15377Р, Н1Н15381Р, Н1Н15399Р), которые продемонстрировали повышенную выживаемость, вводили профилактически в двух различных дозах и сравнивали с двумя другими антигемолизин А mAb, LC10 и LTM14. Группам самок мышей C57BL/6 (n=5) внутрибрюшинно вводили однократную дозу 1,25 или 0,325 мг/кг каждого отдельного антитела: Н1Н15377Р, Н1Н15381Р, Н1Н15399Р, LTM14, LC10 или изотипически сходного контрольного антитела. Через один день после введения мышам вводили интратрахеально 50 мкл *S.aureus* CA-127 ($1,3 \times 10^8$ КОЕ/мышь), которые выращивали до лог-фазы ($OD_{600} \leq 1$) в TSB при 37°C, промывали и ресуспендировали в PBS. Мышей подвергали эвтаназии в результате анестезии через 18 ч после инфицирования, а легкие извлекали и гомогенизировали. Последовательные разведения лизатов легких высевали на планшеты с TSA. Планшеты инкубировали в течение ночи (16-18 ч) при 37°C и на следующий день подсчитывали бактериальные колонии для определения бактериальной нагрузки.

Все три исследуемые антитела по настоящему изобретению были эффективны при введении в дозе 1,25 мг/кг по сравнению с LTM14, LC10 и изотипически сходным контрольным антителом, уменьшая бактериальную нагрузку в легких на 1 log (фиг. 8a). Н1Н15399Р также было эффективным в снижении бактериальной нагрузки при введении в дозе 0,325 мг/кг (фиг. 8b). Все другие исследуемые антигемолизин А mAb не приводили к значительному уменьшению количества бактерий в легких мышей при настоящей более низкой дозе (фиг. 8b).

Пример 14. Перекрестная конкуренция с использованием Octet между различными антигемолизин А моноклональными антителами с использованием предкомплексного способа.

Для оценки того, конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание эпитопов на гемолизине А (очищенном от *Staphylococcus aureus*), конкуренцию за связывание между антигемолизин А моноклональными антителами определяли с использованием безмаркерного интерферометрического анализа биослоев в режиме реального времени на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. Твин-20, 1,0 мг/мл BSA (буфер Octet HBS-ET) при встряхивании планшета при скорости 1000 об/мин. Около 1,5-2,5 нм антигемолизин А моноклонального антитела вначале захватывали на кончик биосенсора Octet, покрытые анти-hFc антителом (Pall ForteBio Corp., No. 18-5060), погружая кончик на 2 мин в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора антигемолизин А моноклонального антитела (mAb-1). Затем кончик биосенсора, захваченные антителами, насыщали блокирующим моноклональным антителом изотипического контроля Н4Н (блокирующим mAb), в результате погружения в лунки, содержащие 100 мкг/мл раствора блокирующего mAb, в течение 3 мин. После этого кончик биосенсора погружали на 4 мин в лунки, содержащие 100 нМ гемолизина А, предварительно инкубированные в течение 2 ч с 1 мкМ второго антигемолизин А моноклонального антитела (mAb-2). Кончик биосенсора промывали в буфере Octet HBS-ET в промежутке между каждой стадией эксперимента. Реакцию связывания в реальном времени контролировали в течение эксперимента, а ответ при связывании в конце каждой стадии фиксировали. Реакцию связывания гемолизина А и предварительно образовавшего комплекс mAb-2 с mAb-1 корректировали с учетом фонового связывания, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных антигемолизин А моноклональных антител. В табл. 17 явно указаны связи антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Таблица 17

**Перекрестная конкуренция антигемолизин А антител
за связывание с гемолизином А**

Первое mAb (mAb-1), захваченное с использованием биосенсоров АНС Octet	Антитела mAb-2, способные конкурировать с mAb-1
H1H15404P	H1H15410P, H1H15376P, H1H15418P2
H1H15410P	H1H15404P, H1H15376P, H1H15418P2
H1H15376P	H1H15404P, H1H15410P, H1H15418P2, H1H15375P, H1H15377P, H1H15405P
H1H15418P2	H1H15404P, H1H15410P, H1H15376P, H1H15375P, H1H15377P, H1H15405P
H1H15375P	H1H15376P, H1H15418P2, H1H15377P, H1H15405P, H1H15379P, H1H15408P, H1H15381P, H1H15378P, H1H15399P
H1H15377P	H1H15376P, H1H15418P2, H1H15375P, H1H15405P, H1H15379P, H1H15408P, H1H15381P, H1H15378P, H1H15399P
H1H15405P	H1H15376P, H1H15418P2, H1H15375P, H1H15377P, H1H15379P, H1H15408P, H1H15381P, H1H15378P, H1H15399P
H1H15379P	H1H15375P, H1H15377P, H1H15405P, H1H15408P, H1H15381P, H1H15378P, H1H15399P, H1H15420P2, H1H15380P, H1H15414P
H1H15408P	H1H15375P, H1H15377P, H1H15405P, H1H15379P, H1H15381P, H1H15378P, H1H15399P, H1H15420P2, H1H15380P, H1H15414P

H1H15381P	H1H15375P, H1H15379P, H1H15399P, H1H15414P	H1H15377P, H1H15408P, H1H15420P2, H1H15414P	H1H15405P, H1H15378P, H1H15380P, H1H15414P
H1H15378P	H1H15375P, H1H15379P, H1H15399P, H1H15414P	H1H15377P, H1H15408P, H1H15420P2, H1H15414P	H1H15405P, H1H15381P, H1H15380P, H1H15414P
H1H15399P	H1H15375P, H1H15379P, H1H15378P, H1H15414P	H1H15377P, H1H15408P, H1H15420P2, H1H15414P	H1H15405P, H1H15381P, H1H15380P, H1H15414P
H1H15420P2	H1H15379P, H1H15378P, H1H15414P	H1H15408P, H1H15399P, H1H15414P	H1H15381P, H1H15380P, H1H15414P
H1H15380P	H1H15379P, H1H15378P, H1H15399P, H1H15420P2	H1H15408P, H1H15399P, H1H15420P2	H1H15381P, H1H15380P, H1H15420P2
H1H15414P	H1H15379P, H1H15378P, H1H15399P, H1H15420P2	H1H15408P, H1H15399P, H1H15420P2	H1H15381P, H1H15380P, H1H15420P2

Настоящее изобретение не предполагает ограничение объема конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к таковым, описанным в настоящем документе, станут очевидными специалистам в настоящей области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Такие модификации предусмотрены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с гемолизином А,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR),

где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 146, 148, 152, 154 и 156 соответственно.

2. Выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из:

(a) связывается с гемолизином А дикого типа при 37°C с константой связывания при равновесии диссоциации (K_D) менее чем около 80 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связывается с гемолизином А дикого типа при 37°C с диссоциационным периодом полужизни ($t_{1/2}$) более чем около 0,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(c) связывается с гемолизином А дикого типа при 25°C со значением K_D менее чем около 30 нМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(d) связывается с гемолизином А дикого типа при 25°C со значением $t_{1/2}$ более чем около 1,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(e) связывается с модифицированным гемолизином А при 37°C с константой связывания при равновесии диссоциации (K_D) менее чем около 20 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(f) связывается с модифицированным гемолизином А при 37°C с диссоциационным периодом полужизни ($t_{1/2}$) более чем около 0,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(g) связывается с модифицированным гемолизином А при 25°C со значением K_D менее чем около 10 нМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(h) связывается с модифицированным гемолизином А при 25°C со значением $t_{1/2}$ более чем около

1,5 мин, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(i) ингибирует гемолиз эритроцитов кролика, опосредованный гемолизином А, штаммом *S.aureus*, выбранным из группы, состоящей из GA201; CA-127; TCH1516; GA229; 8:03; 27-05; 94:1013 и 7031; а также

(j) блокирует взаимодействие между гемолизином А и ADAM10.

3. Выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

4. Выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150.

5. Выделенное человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 142/150.

6. Выделенное человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где указанное антитело содержит

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160; и

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158.

7. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент или одноцепочечную молекулу Fv (scFv).

8. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7, включающий:

(i) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих легкую цепь указанных антитела или фрагмента и тяжелую цепь указанных антитела или фрагмента, в клетку-хозяина;

(ii) культивирование клетки-хозяина в среде для роста в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида(ов).

9. Способ по п.8, дополнительно включающий выделение антитела или фрагмента из клетки-хозяина и/или среды, в котором происходило выращивание клетки-хозяина.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с гемолизином А, который представляет собой продукт способа по п.8 или 9.

11. Изделие для инъекции, содержащее антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и 10.

12. Сосуд для инъекции, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и 10.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с гемолизином А по любому из пп.1-7 и 10, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для профилактики или лечения инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент Fab, фрагмент F(ab'), фрагмент Fv или одноцепочечную молекулу Fv(scFv).

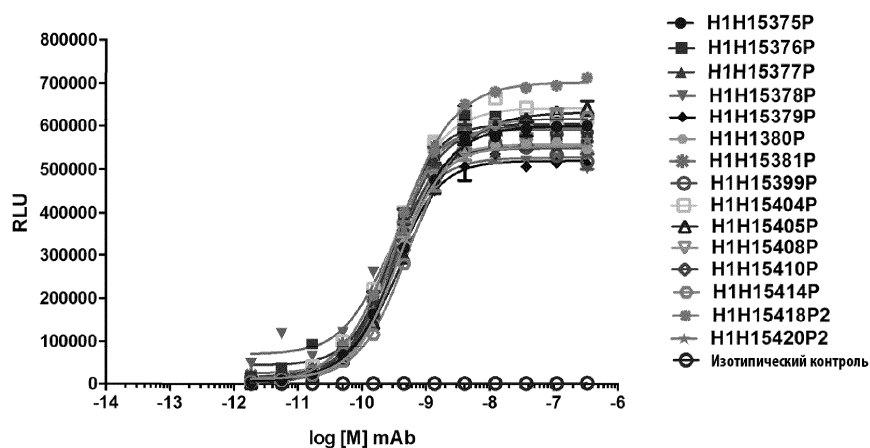
14. Фармацевтическая композиция по п.13, дополнительно содержащая один или более дополнительных терапевтических агентов.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, где дополнительный терапевтический агент представляет собой антибиотик, НСПВС, кортикостероид, антитело LC10, антитело LTM14 и/или преднизон.

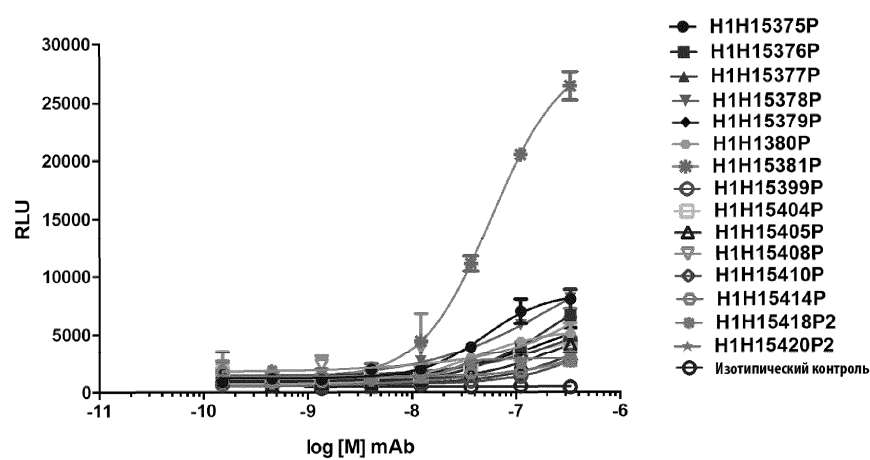
16. Способ профилактики или лечения инфекции, вызываемой *Staphylococcus aureus*, у пациента, включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 и 10 или фармацевтической композиции по любому из пп.13-15 пациенту.

17. Способ по п.16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутривожно, перорально или внутримышечно.

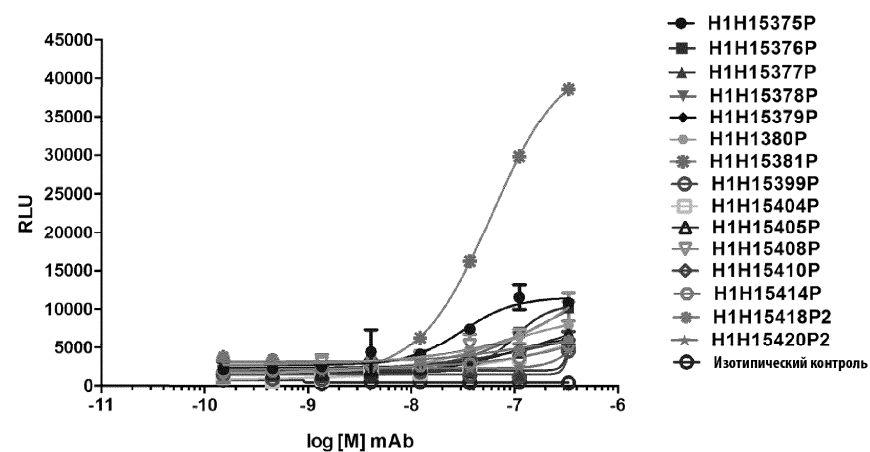
18. Способ по любому из пп.16, 17, где инфекция, вызываемая *Staphylococcus aureus*, приводит к состоянию, выбранному из группы, состоящей из дермонекроза, инфекций кожи и мягких тканей, абсцесса, инфекции в месте хирургического вмешательства, инфекции эндопротезных суставов, бактериемии, септицемии, септического артрита, менингита, остеомиелита, эндокардита, пневмонии, синдрома токсического шока, мастита, фурункулеза, карбункулеза, фурункула; и введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента оказывает лечебный эффект на патологическое состояние.



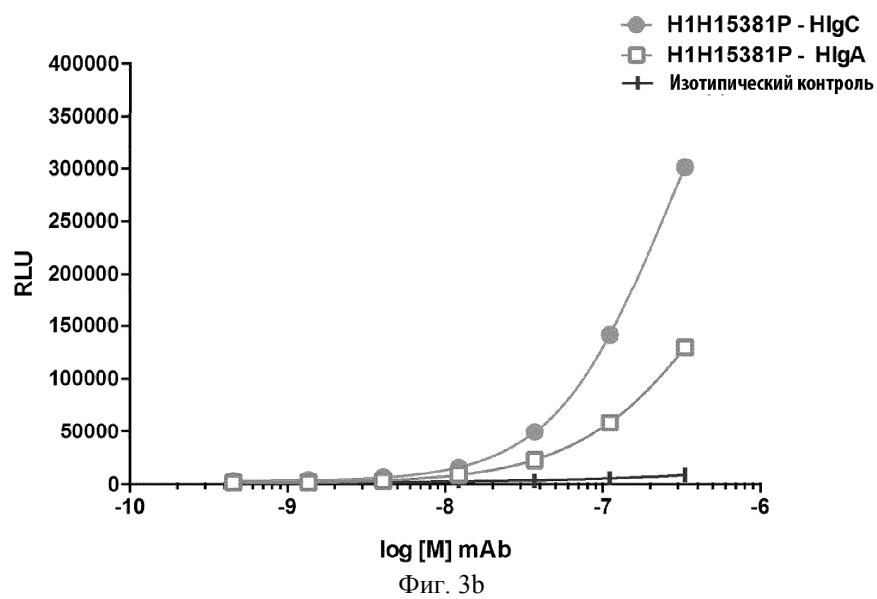
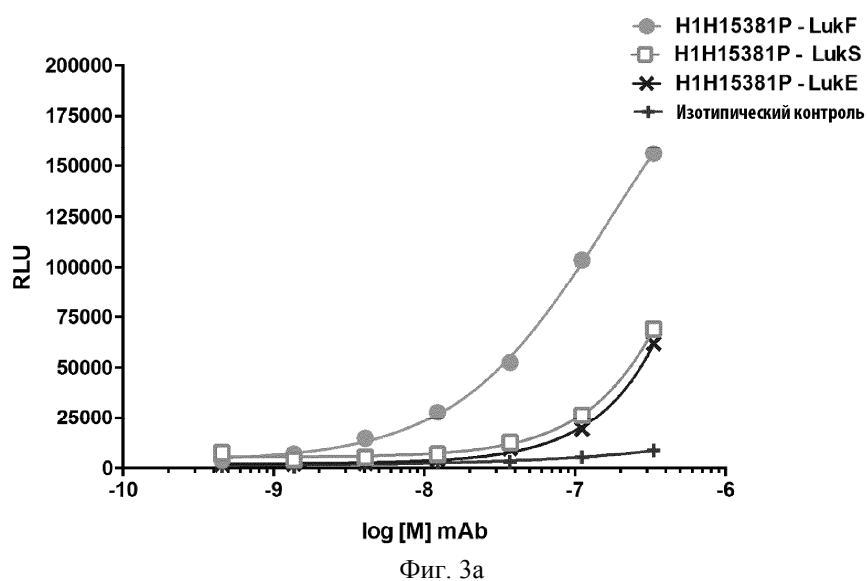
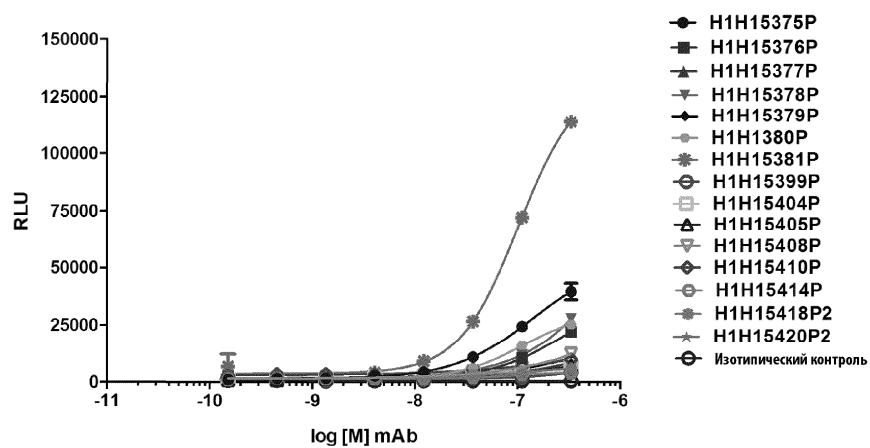
Фиг. 1

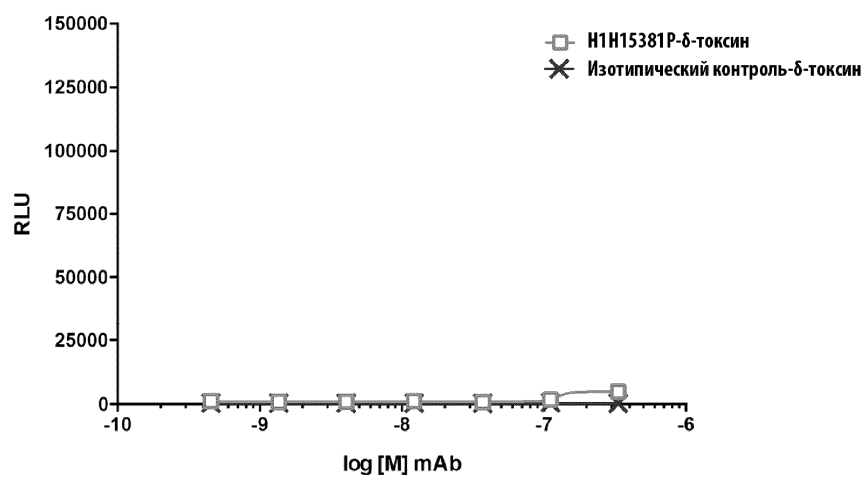


Фиг. 2a

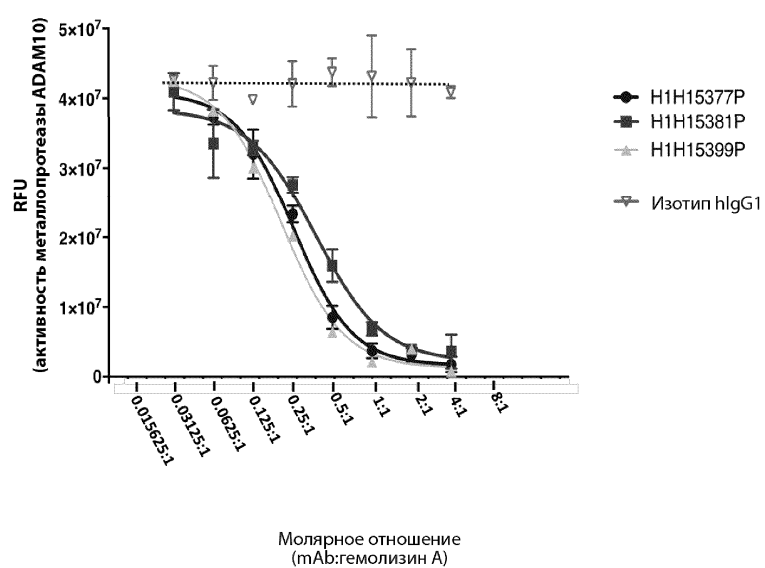


Фиг. 2b

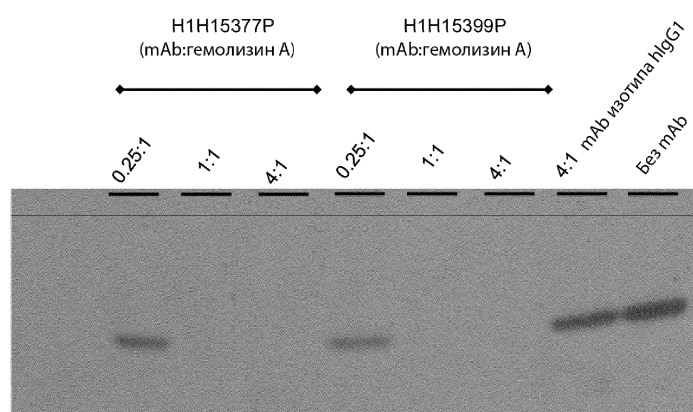




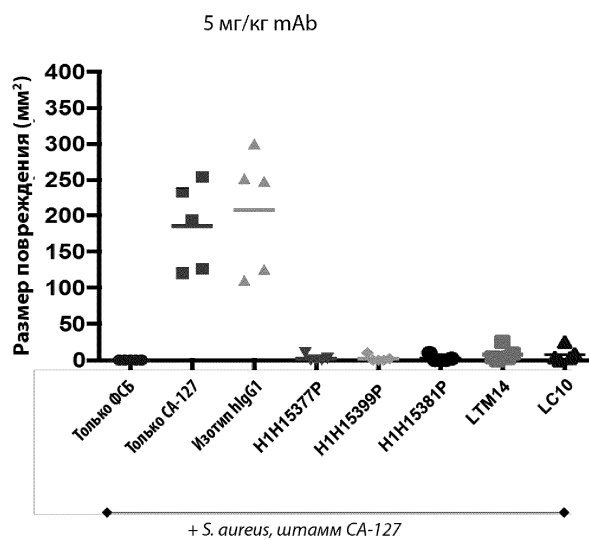
Фиг. 3с



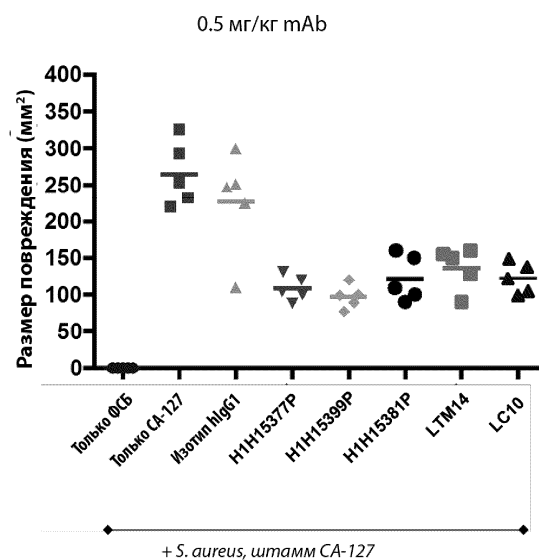
Фиг. 4а



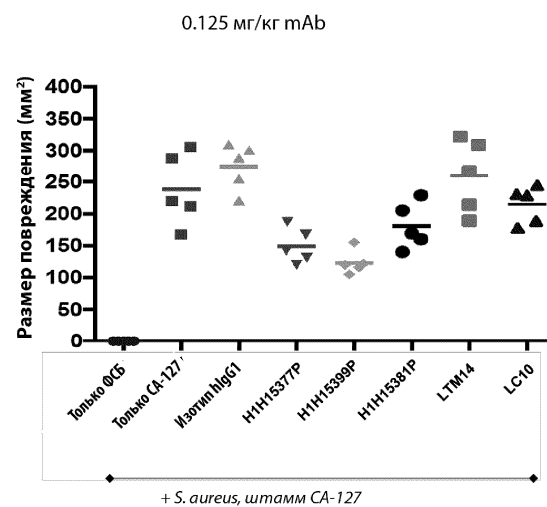
Фиг. 4б



Фиг. 5a

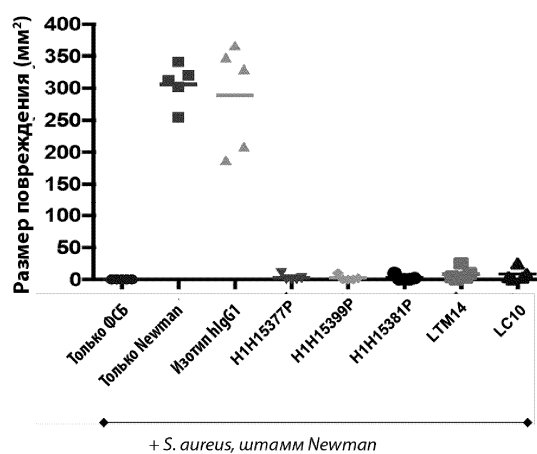


Фиг. 5b



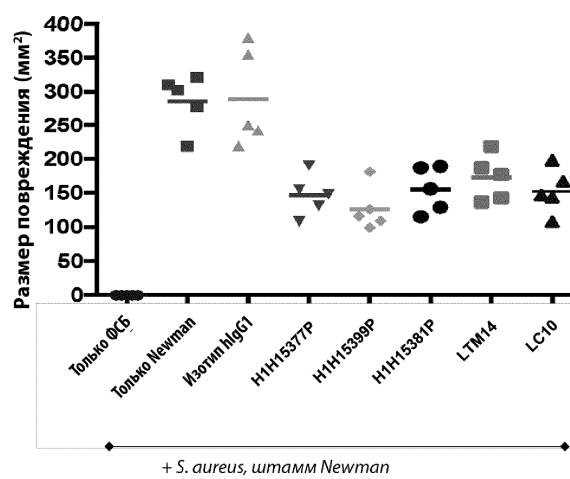
Фиг. 5c

5 мг/кг mAb



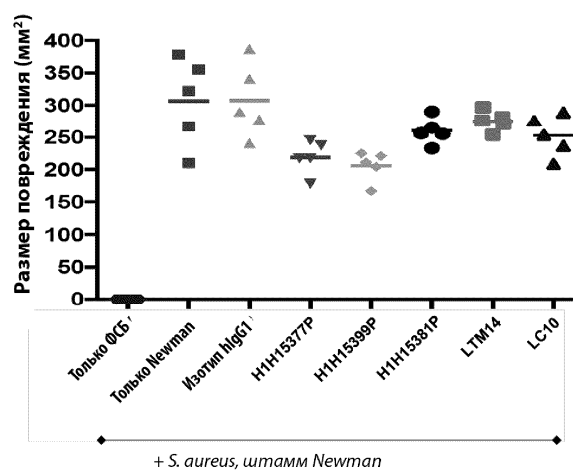
ФИГ. 6а

0.5 мг/кг mAb

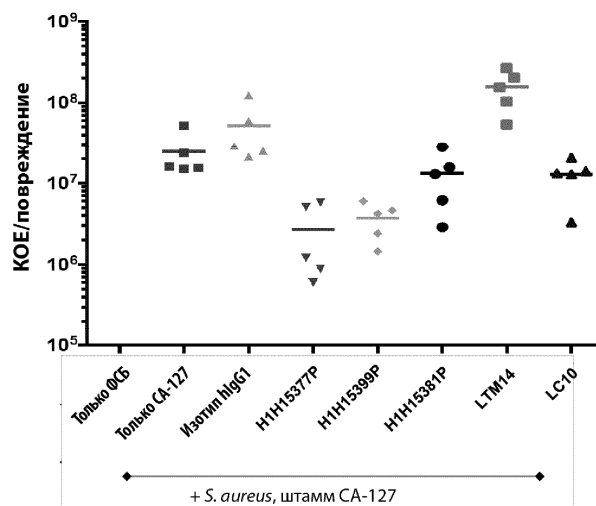


ФИГ. 6b

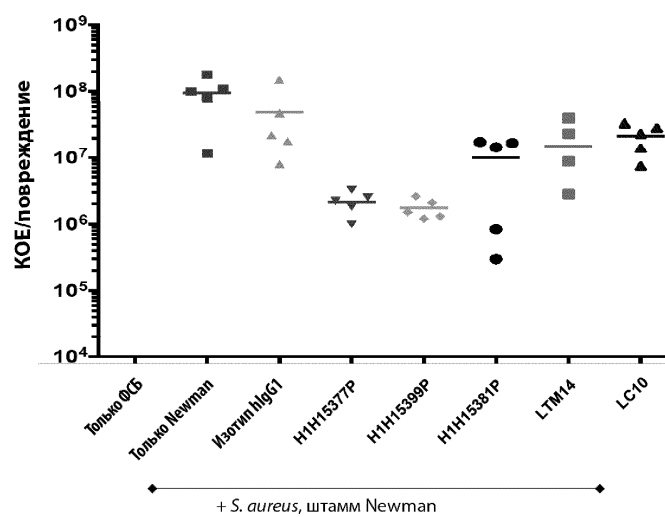
0.125 мг/кг mAb



ФИГ. 6с

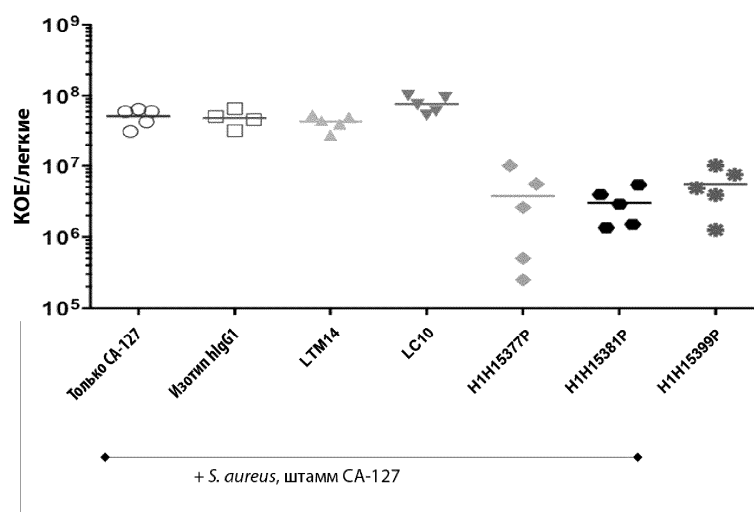
+ *S. aureus*, штамм CA-127 (MRSA)

Фиг. 7а

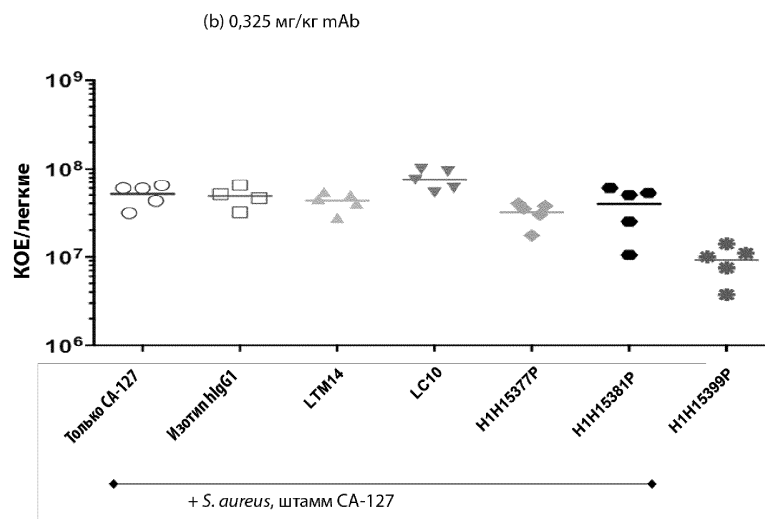
+ *S. aureus*, штамм Newman (MRSA)

Фиг. 7б

(а) 1,25 мг/кг mAb



Фиг. 8а



Фиг. 8b

