

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290650** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.06.14

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/42* (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

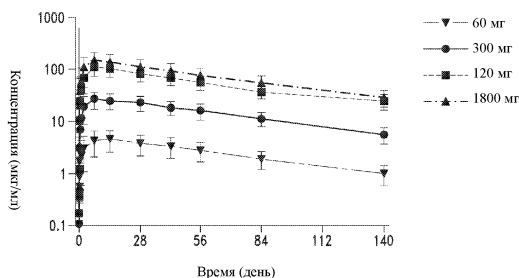
(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А**

(31) 62/893,747; 62/993,519; 63/040,966
(32) 2019.08.29; 2020.03.23; 2020.06.18
(33) US
(86) PCT/US2020/048635
(87) WO 2021/041989 2021.03.04
(71) Заявитель:
ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Пан Филлип С., Коннолли Линн И.,
Могалиан Эрик (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В настоящей заявке описаны антитела, композиции, содержащие антитело, и способы применения для профилактики и лечения вызываемой вирусом гриппа А инфекции. В конкретных вариантах осуществления изобретения однократное введение представленного/представленной в настоящем описании антитела или содержащей антитело композиции можно применять для защиты и/или лечения вызываемой вирусом гриппа А инфекции в течение всего сезона гриппа.



A1

202290650

202290650

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А

5

Сведения, касающиеся перечня последовательностей

Перечень последовательностей, прилагаемый к настоящей заявке, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включен в настоящее описание в качестве ссылки. Обозначение текстового файла, содержащего перечень последовательностей

10 930485_413WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Размер текстового файла составляет 12,2 кб, он создан 26 августа 2020 г. и представлен в электронном виде через EFS-Web.

Настоящее описание относится к композициям, содержащим антитела, и способам профилактики и лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

15

Предпосылки создания изобретения

Грипп представляет собой инфекционное заболевание, которое распространяется по всему миру в виде ежегодных вспышек, вызывая в год примерно от трех до пяти миллионов случаев серьезной болезни и примерно от

20 290000 до 650000 смертей от респираторных заболеваний (WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 6 ноября 2018 г.). Наиболее распространенные симптомы включают: внезапное повышение температуры, кашель (обычно сухой), головную боль, мышечную и суставную боль, серьезный дискомфорт (плохое самочувствие), боль в горле и насморк. Период инкубации варьируется от

25 одного до четырех дней, хотя, как правило, симптомы начинают проявляться примерно через два дня после контакта с вирусом. Осложнениями гриппа могут являться пневмония, синуситы и ухудшение имеющихся ранее проблем со здоровьем, таких как астма или сердечная недостаточность, сепсис или обострение хронических основных заболеваний.

30 Грипп вызывается вирусом гриппа, относящимся к антигенно и генетически разнообразной группе вирусов семейства *Orthomyxoviridae*, геном которых представлен отрицательно полярной одноцепочечной сегментированной РНК. Из четырех типов вируса гриппа (А, В, С и D) три типа (А, В и С) поражают людей.

Вирусы гриппа типа А представляют собой наиболее вирулентные патогены человека и вызывают наиболее серьезное заболевание. Вирусы гриппа А можно классифицировать на основе различных подтипов присутствующих основных поверхностных белков: гемагглютенина (НА) и нейраминидазы (НА). Известно по меньшей мере 18 подтипов вируса гриппа А, которые определяются их белками гемагглютенина («НА»). НА можно подразделять на две группы. Группа 1 содержит подтипы Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16 и Н17, а группа 2 включает подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15. В то время как все подтипы присутствуют в птицах, болезни у людей в основном вызываются подтипами Н1, Н2 и Н3. Подтипы Н5, Н7 и Н9 вызывают серьезные спорадические инфекции у людей и могут приводить к новой пандемии. Вирусы гриппа А постоянно эволюционируют, создавая новые варианты, это явление называют антигенным дрейфом. Как следствие, антитела, выработанные в ответ на встречавшиеся ранее вирусы, плохо защищают или вообще не защищают от новых «дрейфующих» вирусов. В результате требуется каждый год получать новую вакцину против вирусов Н1 и Н3, которые по прогнозам могут появиться, этот процесс является очень дорогостоящим, а также не всегда эффективным. Аналогичное положение относится к производству вакцины против вируса гриппа Н5.

НА является основным поверхностным белком вируса гриппа А, который представляет собой основную мишень нейтрализующих антител, которые индуцируются инфекцией или вакцинацией. НА ответствен за связывание вируса с клетками с сиаловой кислотой на мембранах, такими как клетки в верхних дыхательных путях или эритроциты. Кроме того, НА опосредует слияние вирусной оболочки с мембраной эндосомы после снижения рН. НА представляет собой гомотримерный интегральный мембранный гликопротеин. Тример НА состоит из трех идентичных мономеров, каждый из которых образован из единичной полипептидной цепи интактного НА0 с областями НА1 и НА2, соединенными с помощью двух дисульфидных мостиков. Каждая НА2-область принимает альфа-спиральную структуру «coiled coil» и преимущественно образует область «ствола» или «стебля» НА, в то время как НА1-область представляет собой небольшой глобулярный домен, содержащий смесь α/β -структур («головная» область НА). Глобулярная головная область НА

опосредует связывание с сиаловой кислотой-рецептором, в то время как ствол
НА опосредует последующее слияние между вирусами и клеточными
мембранами, которое запускается в эндосомах при снижении значения pH. В то
время как иммунодоминантный глобулярный головной домен НА обладает
5 высокой пластичностью, при которой различные антигенные сайты постоянно
подвергаются антигенному дрейфу, стволовая область НА является
относительно консервативной среди подтипов. Современные вакцины против
гриппа главным образом индуцируют иммунный ответ против
иммунодоминантной и вариабельной головной области НА, которая
10 эволюционирует быстрее, чем стволовая область НА (Kirkpatrick E., Qiu X.,
Wilson P.C., Bahl J., Krammer F., The influenza virus hemagglutinin head evolves
faster than the stalk domain. Sci Rep. 8(1), 11 июля 2018 г., с. 10432). Таким
образом, конкретная вакцина против гриппа, как правило, обеспечивает защиту в
течение не более чем нескольких лет и требуется ежегодная реконструкция
15 вакцин против гриппа.

Для решения указанных проблем в последние годы разработан новый класс
нейтрализующих вирус гриппа антител, мишенью которых являются
консервативные сайты в стволе НА, в качестве терапии против вируса гриппа.
Эти антитела, таргетирующие стволовую область НА, как правило, обладают
20 более широким спектром нейтрализации по сравнению с антителами,
таргетирующими головную область НА. Обзор обладающих широким спектром
действия нейтрализующих антител против вируса гриппа А представлен у Corti
D. и Lanzavecchia A., Broadly neutralizing antiviral antibodies. Annu. Rev.
Immunol. 31, 2013, сс. 705–742. У Okuno с соавторами описана иммунизация
25 мышей вирусом гриппа A/Okuda/57 (H2N2) и выделение моноклонального
антитела (C179), которое связывается с консервативным конформационным
эпитопом в HA2 и нейтрализует подтипы H2, H1 и H5 группы 1 вирусов гриппа
A, *in vitro* и на животных моделях *in vivo* (Okuno и др., 1993; Smirnov и др., 1999;
Smirnov и др., 2000). Другие примеры антител, таргетирующих стволовую
30 область НА, включают CR6261 (Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M.,
Poon L.L.M., Alard P., Cornelissen L. и др., Heterosubtypic Neutralizing Monoclonal
Antibodies Cross-Protective against H5N1 and H1N1 Recovered from Human IgM⁺
Memory B Cells. PLoS ONE 3(12), 2008: e3942.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>; Friesen R.H.E., Koudstaal W., Koldijk M.H., Weverling G.J., Brakenhoff J.P.J, Lenting P.J. и др. New Class of Monoclonal Antibodies against Severe Influenza: Prophylactic and Therapeutic Efficacy in Ferrets. PLoS ONE 5(2), 2010: e9106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009106>),
5 F10 (Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., Wan H., Murakami A., Yammanuru A., Han T., Cox N.J., Bankston L.A., Donis R.O., Liddington R.C., Marasco W.A., Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. Nature Structural & Molecular Biology. 16 (3), март 2009 г., сс. 265–273. doi:10.1038/nsmb.1566), CR8020 (Ekiert D.C., Friesen R.H.E., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M. и др., A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. Science 333(6044), 2011, сс. 843–850), FI6 (Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A. и др., A neutralizing antibody selected from plasma
10 cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. Science 333(6044), 2011, сс. 850–856) и CR9114 (Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R. и др., Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. Science 337(6100), 2012, сс. 1343–1348).

Однако антитела, обладающие способностью давать реакцию со стволовой областью НА подтипов из обеих групп 1 и 2, являются очень редкими и, как
20 правило, для них не установлена способность полностью охватывать все подтипы. В последние годы описано антитело MEDI8852, которое нейтрализует вирусы гриппа А групп 1 и 2, обладает способностью нейтрализовать разнообразную панель репрезентативных вирусов, возникших в течение >80 лет эволюции антигенов (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. и др., Structure and
25 Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. Cell 166(3), 2016, сс. 596-608; Paules C. I. и др., The Hemagglutinin A Stem Antibody MEDI8852 Prevents and Controls Disease and Limits Transmission of Pandemic Influenza Viruses. J Infect Dis 216, 2017, сс. 356–365, <https://doi.org/10.1093/infdis/jix292>). Установлено, что MEDI8852 связывается с
30 высоко консервативным эпитопом, что существенно отличает его от других нейтрализующих антител, реактивных в отношении структурно охарактеризованных стволов (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. и др.,

Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. Cell, 166(3), 2016, сс. 596-608).

Несмотря на постоянные предпринимаемые усилия, сохраняется потребность в композициях антител и способах, которые можно использовать для профилактики и/или лечения гриппа А.

Подробное описание изобретения

В настоящем описании предложены фармацевтические композиции, включающие антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, и способы применения указанных композиций. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции включают антитело, которое нейтрализует вирус гриппа А и сохраняет системное воздействие на субъекта в течение периода времени, выбранного из по меньшей мере 10 недель, по меньшей мере 15 недель и по меньшей мере 20 недель после однократного введения. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело и фармацевтическая композиция хорошо переносятся субъектом при введении в профилактически эффективных количествах. В других вариантах осуществления изобретения антитело и фармацевтическая композиция хорошо переносятся субъектом при введении в терапевтически эффективных количествах. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, включают введение содержащей антитело композиции, представленной в настоящем описании, субъекту, который имеет риск заражения гриппом А. В следующих вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, включают введение содержащей антитело композиции, представленной в настоящем описании, субъекту, зараженному гриппом А.

Хотя антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа А, фармацевтические композиции, включающие указанные антитела, и способы применения указанных композиций подробно описаны ниже, должно быть очевидно, что настоящее описание не ограничено конкретными методологиями, протоколами и реагентами, указанными в настоящем описании, которые могут варьироваться. Кроме того, должно быть очевидно, что применяемая в настоящем описании терминология не направлена на ограничение объема настоящего изобретения. Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в

настоящем описании, имеют общепринятые значения, известные обычному специалисту в данной области.

Ниже представлены объекты настоящего изобретения. Представлены некоторые варианты осуществления изобретения, однако, должно быть
5 очевидно, что их можно объединять любым образом и в любом количестве, создавая дополнительные варианты осуществления изобретения. Не следует считать, что различные описанные примеры и варианты осуществления изобретения ограничивают настоящее изобретение только конкретно описанными вариантами его осуществления. Следует понимать, что настоящее
10 описание подтверждает и охватывает варианты осуществления изобретения, которые объединяют специально описанные варианты осуществления изобретения с любым количеством заявленных объектов изобретения. Кроме того, любые варианты и комбинации всех описанных в настоящей заявке объектов следует рассматривать как включенные в настоящую заявку, если из
15 контекста не следует иное.

В настоящем описании, если из контекста не требуется иное, подразумевается, что понятие «содержат» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий» (или «имеющий», «имеет», «включающий», «включает» и т.д.)
включает указанный элемент, соотношение, целое число (включая при
20 необходимости его часть; например, одну десятую и одну сотую часть целого числа), концентрацию или стадию, но не исключает какие-либо другие не указанные элемент, целое число, концентрацию или стадию.

Понятие «состоящий практически из» не является эквивалентом понятия «содержащий» и относится к конкретным заявляемым материалам или стадиям
25 или к тем материалам или стадиям, которые не оказывают существенное воздействие на основные характеристики, заявляемого объекта изобретения. Например, белковый/белковая домен, область или модуль (например, связывающий домен) или белок «состоит практически из» конкретной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность
30 домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации или их комбинацию (например, аминокислот на амино- или карбоксильном конце или между доменами), которые в сочетании затрагивают максимум 20% (например, максимум 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) длины

домена, области, модуля или белка, и не оказывают существенное воздействие на активность (т.е. не уменьшают активность более чем на 50%, например, не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) домена(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, на аффинность связывающего белка в отношении связывания мишени).

Понятие «состоят из» является конкретным вариантом понятия «содержат», из которого исключены любые другие не указанные элемент, целое число или стадия. В контексте настоящего описания понятие «содержат» включает понятие «состоят из». Таким образом, под понятие «содержащий» подпадают понятия «включающий», а также «состоящий», например, композиция, «содержащая» X, может состоять исключительно из X или может включать дополнительный компонент, например, X + Y.

Кроме того, должно быть очевидно, что индивидуальные соединения или группы соединений, полученные в результате различных комбинаций структур и заместителей, указанных в настоящем описании, включены в настоящую заявку таким образом, как если бы каждое соединение или группа соединений были указаны индивидуально. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей подпадает под объем настоящего описания.

Употребление понятия в единственном числе и аналогичные ссылки в контексте описания изобретения (в том числе, в контексте формулы изобретения) относится к его употреблению и в единственном, и во множественном числе, если в настоящем описании не указано иное или если это явно противоречит контексту. Перечисление диапазонов величин в настоящем описании служит исключительно в качестве более краткого метода ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, подпадающую под указанный диапазон. Если в настоящем описании не указано иное, то каждая индивидуальная величина включена в описание таким образом, как если бы она была индивидуально указана в настоящем описании. Никакой употребляемый в настоящем описании язык не следует рассматривать в качестве указания на какой-либо незаявленный и важный для воплощения изобретения на практике элемент.

Понятие «практически» не исключает «полностью», например, композиция, которая «практически свободна от» Y, может быть полностью свободна от Y. В

некоторых вариантах осуществления изобретения «практически» относится к данному количеству, действию или данной активности композиции, способа или применения, указанных в настоящем описании, по сравнению с референс-композиций, референс-способом или –применением, и относится к снижению количества, действия или активности не более чем на 50%, например, не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, или 1% или менее относительно количества, действия или активности референс-композиции, референс-способ или референс–применения.

Понятие «примерно» касательно численного значения x означает $x \pm 10\%$, например, $x \pm 5\%$, или $x \pm 7\%$, или $x \pm 10\%$, или $x \pm 12\%$, или $x \pm 15\%$, или $x \pm 20\%$. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения «примерно» означает $\pm 20\%$ от указанных диапазона, величины или структуры.

Подразумевается, что применяемое в настоящем описании понятие «заболевание» имеет общепринятые синонимы и его можно использовать взаимозаменяемо с понятиями «нарушение» и «состояние» (в качестве медицинского состояния), поскольку все они обозначают аномальное состояние организма животного или человека или одной из его частей, ухудшающее нормальное функционирование, что, как правило, проявляется в виде различных признаков и симптомов и приводит к пониженной продолжительности жизни или ухудшению качества жизни человека или животного.

В контексте настоящего описания понятие «терапевтически эффективная/эффективное» относится к природе или количеству фармацевтической композиции или антитела, которые указаны в настоящем описании, достаточным для обеспечения благоприятного воздействия на субъекта. В контексте настоящего описания благоприятное воздействие на субъекта представляет собой лечение инфекции, вызываемой гриппом А. В контексте настоящего описания подразумевается, что «лечение» субъекта или пациента включает предупреждение, профилактику, ослабление, облегчение симптомов и терапию. Благоприятные воздействия лечения включают улучшение клинического исхода; уменьшение или облегчение симптомов, связанных с инфекцией; уменьшение частоты симптомов; улучшение качества жизни; более длительный без рецидивный статус; предупреждение инфекции; уменьшение степени и/или продолжительности инфекции; стабилизацию

болезненного состояния; задержку прогрессирования заболевания; ремиссию; выживание; длительное выживание; или любую их комбинацию. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретения понятие «терапевтически эффективное» охватывает как лечение субъектов, инфицированных гриппом А, так и предупреждение или профилактику заражения субъекта гриппом А. В тех случаях, когда предполагаемое лечение является профилактическим, понятия «терапевтически эффективный» и «профилактически эффективный» могут использоваться взаимозаменяемо. Понятия «субъект» или «пациент» в настоящем описании применяют взаимозаменяемо для обозначения людей, которые восприимчивы к заражению гриппом А или уже заражены гриппом А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус гриппа А включает вирус H1N1, вирус H3N2 или их обоих.

Дозы часто выражают относительно веса тела (т.е. веса тела субъекта). Так, доза, выраженная в виде [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т.д.), как правило, относится к [г, мг или другая единица] «на кг (или г, мг и т.д.) веса тела», даже, если понятие «вес тела» специально не упоминается.

Понятие «специфическое связывание» и аналогичные понятия не включают неспецифическое прилипание.

В контексте настоящего описания понятие «антитело» охватывает различные формы антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) полные антитела (содержащие по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями (хотя следует понимать, что тяжелые цепи антител, у которых отсутствуют легкие цепи, все еще подпадают под понятие «антитело»)), фрагменты антител, которые имеют или сохраняют способность связываться с молекулой антигена-мишени, распознаваемой интактным антителом, такие, например, как scFv-, Fab- или F(ab')₂-фрагмент, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и генетически или иным образом сконструированные или модифицированные антитела (например, варианты антител или мутантные антитела, внутриклеточные антитела (интрабоди), пептидные антитела (пептибоди), химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгаты антител, мультиспецифические, например, биспецифическим антитела, димерные

антитела (диабоди), тримерные антитела (триабоди) и тетрамерные антитела (тетрабоди), tandemный ди-scFv, tandemный три-scFv и другие форматы антител, известные в данной области), если они сохраняют характерные особенности, указанные в настоящем описании. Так, в контексте настоящего описания

5 понятие «антитело» используют в его наиболее широком смысле, и оно включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагмент антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, F(ab')₂-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG),
10 одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанободи). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное
15 антитело. Например, антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело. Если не указано иное, то следует понимать, что понятие «антитело» включает функциональные фрагменты антитела (т.е. содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента антитела, который сохраняет способность связываться с антигеном). Под понятие подпадают также интактные или
20 полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы (IgG1, IgG2, IgG2, IgG4), IgM, IgE, IgA и IgD).

Таким образом, антитела, представленные в настоящем описании, могут относиться к любому изотипу (например, IgA, IgG, IgM, иметь тяжелую α-, γ- и μ-цепь соответственно). Например, в некоторых вариантах осуществления
25 изобретения антитело имеет IgG-тип. Антитела IgG-изотипа могут относиться к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит аминокислотную последовательность из двух различных изотипов (например, обмен аминокислотными последовательностями константного домена), в результате,
30 например, антитело содержит константную область, которая содержит аминокислотную последовательность из антитела IgA-типа и аминокислотную последовательность из антитела IgG-типа. Представленные в настоящем описании антитела могут содержать легкую κ- или λ-цепь. В некоторых

вариантах осуществления изобретения антитело относится к IgG1-типу и содержит легкую к-цепь.

Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M. A. и van de Winkel J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс. 368-374). Человеческие антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые могут после иммунизации продуцировать полный спектр человеческих антител или выбранные человеческие антитела в отсутствии эндогенного производства иммуноглобулинов. Перенос массива генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в указанную зародышевую мутантную мышиную линию может приводить к производству человеческих антител после контрольного заражения антигеном (см., например, Jakobovits A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 2551-2555; Jakobovits A. и др., Nature, 362, 1993, сс. 255-258; Bruggemann M. и др., Year Immunol. 7, 1993, с. 3340). Человеческие антитела можно получать также в фаговых дисплейных библиотеках (Hoogenboom H. R. и Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388; Marks J. D. и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно применять также методики, описанные у Cole с соавторами и Boerner с соавторами (Cole и др., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, изд-во Alan R. Liss, 1985, с. 77 и Boerner P. и др., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела получают с помощью усовершенствованной иммортализации клеток EBV-B согласно методу, описанному у Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A., An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. Nat Med. 10(8), 2004, сс. 871-875.

В контексте настоящего описания понятие «вариабельная область» (вариабельная область легкой цепи (V_L) и вариабельная область тяжелой цепи (V_H)) означает каждую из пары легких и тяжелых цепей, которая непосредственно участвует в связывании антитела с антигеном. Иными словами, понятия « V_L » или « V_L » и « V_H » или « V_H » относятся к вариабельной связывающей области из легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела соответственно.

Антитела, включенные в фармацевтические композиции и способы, представленные в настоящем описании, как правило, содержит (по меньшей мере) три определяющих комплементарность участка (CDR) на тяжелой цепи (или вариабельной области тяжелой цепи) и (по меньшей мере) три CDR на легкой цепи (или вариабельной области легкой цепи. Определяющие комплементарность участки (CDR) представляют собой гипервариабельные участки («HVR»); CDR являются синонимом HVR) присутствуют в вариабельных доменах тяжелых цепей и вариабельных доменах легких цепей. Как правило, CDR тяжелой цепи и связанной с ней легкой цепи антитела вместе образуют антигенсвязывающий центр (и в целом, вместе обуславливают специфичность в отношении антигена и/или аффинность связывания антитела). Как правило, три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) отделены друг от друга последовательностью каркасного участка в вариабельном домене. В целом, в каждом антигенсвязывающем центре находится шесть CDR (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2 и CDRH3; легкая цепь: CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Например, одна молекула антитела, содержащая два антигенсвязывающих центра, содержит двенадцать CDR. CDR на тяжелой и/или легкой цепи могут разделяться в первичной аминокислотной последовательности каркасными участками, где каркасный участок (FR) в вариабельном домене является менее вариабельным (т.е. изменяться от одного антитела к другому (например, от одного антитела к другому, кодируемому таким же аллелем или такими же аллелями)), по сравнению с CDR. Например, цепь (или каждая цепь соответственно) может состоять из четырех каркасных участков, которые разделяются тремя CDR. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH антитела содержит четыре FR и три CDR, расположенные следующим образом: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4; и VL антитела содержит четыре FR и три CDR, расположенные следующим образом: FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4. В целом, VH и VL вместе образуют антигенсвязывающий центр посредством их соответствующих CDR, хотя, как должно быть очевидно, в некоторых случаях сайт связывания может быть образован или состоять из одного, двух, трех, четырех или пяти CDR.

Были определены последовательности тяжелых и легких цепей приведенных в качестве примера антител, представленных в настоящем

описании, которые содержали три различных CDR на тяжелой цепи и три различных CDR на легкой цепи. Положение аминокислот CDR определяли согласно системе нумерации IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc, M.-P. и др. Nucleic Acids Res. 37, 2009, D1006-D1012).

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело должно присутствовать в фармацевтической композиции, практически свободной от других полипептидов, например, на долю других полипептидов приходится менее чем 90% (в пересчете на массу) или менее 60%, или менее 50% фармацевтической композиции.

10 Антитела, представленные в настоящем описании, могут обладать иммуногенностью в организме человека-хозяина и/или животных-хозяев кроме человека (или гетерологичных хозяев), например, в организме мышей. Например, антитела могут иметь идиотип, иммуногенный в организме животных-хозяев кроме человека, но не в организме человека-хозяина.

15 Антитела, представленные в настоящем описании, предназначенные для применения на людях, включают антитела, которые нельзя легко выделять из таких хозяев, как мыши, козы, кролики, крысы, приматы кроме человека и т.д., и которые, как правило, нельзя получать путем гуманизации или из мышей после ксенотрансплантации (модель хено-mice). В некоторых вариантах
20 осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, является неиммуногенным или практически неиммуногенным для человека.

 В контексте настоящего описания «нейтрализующее антитело» представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, т.е. предупреждать, ингибировать, снижать, затруднять или воздействовать на
25 способность патогена иницировать и/или поддерживать инфекцию у хозяина. Понятия «нейтрализующее антитело» и «антитело, которое нейтрализует» или «антитела, которые нейтрализуют» применяют в настоящем описании взаимозаменяемо.

 В контексте настоящего описания понятие «мутация» относится к
30 изменению в нуклеотидной последовательности и/или в аминокислотной последовательности по сравнению с референс-последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с геномной последовательностью, может представлять собой,

например (встречающуюся в естественных условиях) соматическую мутацию, спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, мутацию, индуцированную ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацию, полученную с помощью сайтнаправленного мутагенеза (методы

5 молекулярной биологии для получения специфических и преднамеренных изменений в нуклеотидной последовательности и/или в аминокислотной последовательности). Таким образом, следует понимать, что понятия «мутация» или «мутировать» включают также созданную физическим путем мутацию, например, в нуклеотидной последовательности или аминокислотной

10 последовательности. Мутация включает замену, делецию и инсерцию одного или нескольких нуклеотидов или одной или нескольких аминокислот, а также инверсию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для создания мутации в аминокислотной последовательности мутацию можно интродуцировать в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную

15 аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутантного полипептида. Мутацию можно создавать, например, путем изменения, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующего одну аминокислоту, с получением кодона, кодирующего другую аминокислоту, или путем синтеза

20 варианта последовательности, например, на основе знания о нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, и путем разработки синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует вариант полипептида, без необходимости в осуществлении мутации одного или нескольких нуклеотидов

25 молекулы нуклеиновой кислоты.

В настоящем описании процитировано несколько документов. Каждый из документов, процитированных выше или ниже в настоящем описании (включая все патенты, заявки на патент, научные публикации, спецификации

30 производителя, инструкции и т.д.), полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. Ничто из изложенного в настоящем описании не следует истолковывать как допущение того, что изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию сущности в силу предшествующего изобретения.

Должно быть очевидно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами и реагентами, указанными в настоящем описании, которые могут варьировать. Кроме того, должно быть очевидно, что применяемая в настоящем описании терминология не направлена на ограничение объема настоящего изобретения, который может быть ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в настоящем описании, имеют общепринятые значения, известные обычному специалисту в данной области.

Антитела

Антитела, предназначенные для применения в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, нейтрализуют вирус гриппа А. Кроме того, антитела, представленные в настоящем описании, имеют время полужизни *in vivo*, обеспечивающее системное воздействие в течение пролонгированного периода времени при введении субъекту в хорошо переносимых дозах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела, представленные в настоящем описании, нейтрализуют вирус гриппа А и обеспечивают системную экспозицию у субъекта в течение периода времени, выбранного из по меньшей мере 10 недель, по меньшей мере 15 недель и по меньшей мере 20 недель после однократного введения. В конкретных вариантах осуществления изобретения по сравнению с применяемым для сравнения или референс-антителом антитела, включенные в фармацевтические композиции и способы, представленные в настоящем описании обладают повышенной эффективностью, несмотря на сходные концентрации антитела в плазме по сравнению с применяемым для сравнения или референс-антителом.

Антитела, предназначенные для применения в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, связываются с гемагглютинином вируса гриппа А и поэтому могут нейтрализовать инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, связывается с тем же эпитопом стволовой области гемагглютинина вируса гриппа А (IAV HA), что и антитело MEDI8852 (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. и др., Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. Cell,

166(3), 2016, сс. 596-608), обеспечивая тем самым столь же широкую защиту против различных серотипов вируса гриппа А всех подтипов вируса гриппа А.

Кроме того, антитела, которые можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, включают две
5 мутации в константной области тяжелой цепи (в CH3-участке): M428L и N434S. В этом контексте аминокислотные положения нумеровали согласно принятой в данной области системе EU-нумерации. Понятия «EU-индекс» или «EU-индекс согласно Кэботу», или «EU-нумерация» относятся к EU-нумерации антител (Edelman G.M., Cunningham B.A., Gall W.E., Gottlieb P.D., Rutishauser U., Waxdal
10 M.J., The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. Proc Natl Acad Sci U S A, 63(1), 1969, сс. 78-85; Kabat E.A., National Institutes of Health (U.S.) Office of the Director, Sequences Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991, публикация в полном объеме включена
15 в настоящее описание в качестве ссылки).

Для изучения и количественной оценки инфекционности вируса (или «нейтрализации») в лабораторных условиях специалисту в данной области известны различные стандартные «анализы нейтрализации». Для осуществления анализа нейтрализации, как правило, вирусы животных размножают в клетках
20 и/или линиях клеток. Например, при осуществлении анализа нейтрализации культивируемые клетки можно инкубировать с фиксированным количеством вируса гриппа А (IAV) в присутствии подлежащего тестированию антитела (или без него). Для считывания данных можно применять, например, проточную цитометрию. Альтернативно этому, можно применять также другие методы
25 считывания данных.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой моноклональное антитело. Например, антитело,
30 указанное в настоящем описании, представляет собой человеческое моноклональное антитело.

Антитела, представленные в настоящем описании, могут относиться к любому изотипу (например, IgA, IgG, IgM, т.е. иметь тяжелую α -, γ - или μ -цепь).

Например, антитело может относиться к IgG-типу. В пределах IgG-изотипа антитела могут относиться к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, IgG1. Антитела, представленные в настоящем описании, могут иметь легкую к- или λ -цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет легкую каппа к)-цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к IgG1-типу и имеет легкую к-цепь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции и способы, представленные в настоящем описании, включают антитело, которое содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; и мутации M428L и N434S (согласно EU-нумерации) в константной области тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции и способы, представленные в настоящем описании, включают (выделенное) антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности (последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно).

Идентичность последовательностей, как правило, рассчитывают относительно всей длины референс-последовательности (т.е. последовательности, на которую сделана ссылка в настоящей заявке). В контексте настоящего описания процент идентичности можно определять, например, с помощью BLAST, используя задаваемые по умолчанию параметры, предложенные NCBI (Национальный центр биотехнологической информации;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [матрица Blosum 62; штраф за открытие бреши = 11 и штраф за удлинение бреши = 1].

«Вариант последовательности» имеет измененную последовательность, в которой одна аминокислота или несколько аминокислот в референс-последовательности удалена(ы) или заменена(ы), и/или одна аминокислота или несколько аминокислот встроена(ы) в последовательность аминокислотной референс-последовательности. В результате изменений вариант аминокислотной последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична референс-последовательности. В качестве иллюстрации, вариант последовательности, идентичный по меньшей мере на 70% референс-последовательности, имеет не более 30 изменений, т.е. любых комбинаций делеций, инсерций или замен на 100 аминокислот референс-последовательности.

В целом, хотя могут иметь место неконсервативные аминокислотные замены, замены, как правило, представляют собой консервативные аминокислотные замены, при которых применяемая для замены аминокислота имеет сходные структурные (например, боковую цепь) или химические свойства с соответствующей аминокислотой в референс-последовательности. Например, консервативные аминокислотные замены включают замену одной из алифатических или гидрофобных аминокислот, например, аланина, валина, лейцина и изолейцина, на другую; замену одной из содержащих гидроксил аминокислот, например, серина и треонина, на другую; замену одного из кислых остатков, например, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, на другой; замену одного содержащего амид остатка, например, аспарагина и глутамина, на другой; замену одного ароматического остатка, например, фенилаланина и тирозина, на другой; замену одного основного остатка, например, лизина, аргинина и гистидина, на другой; и замену одной из низкомолекулярных аминокислот, например, аланина, серина, треонина, метионина и глицина, на другую.

В качестве дополнительного примера консервативные замены включают замену в пределах одной из следующих групп: группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T); группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z); группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q); группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H); группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V); и группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). В дополнительном или альтернативном варианте аминокислоты можно группировать в группы консервативных замен по сходной функции, химической структуре или составу (например, кислые, основные, алифатические, ароматические или серосодержащие). Например, алифатическая группа может включать для целей замены Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы для консервативных замен включают: Met и цистеин (Cys или C); кислые: Asp, Glu, Asn и Gln; низкомолекулярные алифатические, неполярные или остатки с невысокой полярностью: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и крупные ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительную информацию можно почерпнуть у Creighton, Proteins, W.H. Freeman and Company, 1984.

Инсерции в аминокислотную последовательность включают amino- и/или карбоксиконцевые слияния, имеющие длину от одного остатка до полипептидов, которые содержат сто или большее количество остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают слияние N- или C-конца аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

«Функциональный вариант» означает полипептид или полинуклеотид, который является структурно сходным или практически структурно сходным с родительским или референс-соединением, указанным в настоящем описании, но несколько отличается по составу (например, одно основание, один атом или одна функциональная группа отличаются, добавлены или удалены), в результате полипептид или кодируемый полипептид обладает способностью осуществлять

по меньшей мере одну функцию родительского полипептида с эффективностью, составляющей по меньшей мере 50%. В конкретных вариантах осуществления изобретения функциональный вариант осуществляет по меньшей мере одну функцию родительского полипептида с эффективностью, выбранной из

5 эффективности, составляющей по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100%. Иными словами, функциональный вариант полипептида или кодируемого полипептида, представленный в настоящем описании, имеет «сходное связывание», «сходную аффинность» или «сходную активность», если функциональный вариант

10 характеризуется не более чем 50%-ным снижением функции в выбранном анализе по сравнению с родительским или референс-полипептидом, например, в анализе измерения аффинности связывания (например, Biacore® или окрашивание тетрамер для измерения константы ассоциации (Ka) или диссоциации (KD)).

15 В контексте настоящего описания «функциональный участок» или «функциональный фрагмент» означает полипептид или полинуклеотид, который содержит только домен, участок или фрагмент родительского или референс-соединения, и полипептид или кодируемый полипептид функционального участка или функционального фрагмента сохраняет по меньшей мере 50%

20 активности, свойственной домену, участку или фрагменту родительского или референс-соединения. В конкретных вариантах осуществления изобретения функциональный участок или функциональный фрагмент сохраняет по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% активности, свойственной домену, участку или фрагменту родительского

25 полипептида. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения функциональный участок или функциональный фрагмент обладает дополнительной биологической ценностью (например, эффекторной функцией). Функциональный участок или функциональный фрагмент полипептида или кодируемого полипептида, представленный в настоящем описании, имеет

30 «сходное связывание» или «сходную активность», если функциональный участок или функциональный фрагмент характеризуется не более чем 50%-ным снижением функции в выбранном анализе по сравнению с родительским или референс-полипептидом. В конкретных вариантах осуществления изобретения

сходное связывание или сходная активность означают процент снижения, выбранный из не более 20%, не более чем 10% и не более чем log-различия по сравнению с родительским или референс-соединением касательно аффинности.

Понятие «выделенный» означает, что материал отделен от его исходного окружения (например, естественного окружения, если он встречается в естественных условиях). Например, встречающаяся/встречающийся в естественных условиях нуклеиновая кислота или полипептид в живом организме не являются выделенными, но эта же нуклеиновая кислота или полипептид, отделенная/отделенный в определенной степени или полностью от присутствующего совместно материала в природной системе, является выделенной/выделенным. Указанная нуклеиновая кислота может являться частью вектора и/или указанная нуклеиновая кислота или указанный полипептид может быть частью композиции (например, клеточного лизата), и все еще являться выделенной/выделенным, поскольку вектор или композиция не является частью естественного окружения нуклеиновой кислоты или полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело в фармацевтической композиции может являться «выделенным», например, поскольку удалено из, отделено от или иным образом не ассоциировано с его окружением *in vivo* у субъекта.

Понятие «ген» означает сегмент ДНК или РНК, участвующий в образовании полипептидной цепи; в некоторых случаях он включает области, расположенные перед и после кодирующей области (например, 5' нетранслируемую область (UTR) и 3' UTR), а также последовательности-вставки (интроны) между индивидуальными кодирующими сегментами (экзоны).

Понятие «интродуцированная» в контексте инсерции молекулы нуклеиновой кислоты в клетку означает «трансфекцию» или «трансформацию», или «трансдукцию» и включает ссылку на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, при этом молекула нуклеиновой кислоты может быть встроена в геном клетки (например, хромосомную, плазмидную, пластидную или митохондриальную ДНК), конвертироваться в автономный ампликон или временно экспрессироваться (например, трансфектированная мРНК).

В контексте настоящего описания понятие «рекомбинантные» (например, рекомбинантное антитело, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота или т.п.) относится к любым молекулам (антителу, белку, нуклеиновой кислоте или т.п.), которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, и которые не встречаются в естественных условиях. «Рекомбинантный» можно применять в качестве синонима с понятием «сконструированный или «не встречающийся в естественных условиях», и оно может относиться к организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые включают по меньшей мере одно генетическое изменение или модифицированы путем интродукции экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом указанные изменения или модификации интродуцируют с помощью генетического конструирования (т.е. вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации, интродуцирующие экспрессируемые молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих белки, слитые белки или ферменты, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновых кислот, или другие функциональные нарушения генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, в которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

В контексте настоящего описания понятие «гетерологичный» или «неэндогенный», или «экзогенный» относится к любому гену, белку, соединению, любой молекуле нуклеиновой кислоты или виду активности, которые не являются нативными для клетки-хозяина или субъекта, или к любому гену, белку, соединению, любой молекуле нуклеиновой кислоты или виду активности, нативными для клетки-хозяина или субъекта, которые изменены. Понятия гетерологичные, неэндогенные или экзогенные относятся к генам, белкам, соединениям или молекулам нуклеиновых кислот, которые подвергали мутации или иным образом изменяли таким образом, что структура, активность или оба этих параметра различались у нативных и измененных генах, белках, соединениях или молекулах нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот могут не являться эндогенными для клетки-хозяина или субъекта, а нуклеиновые кислоты, кодирующие

указанные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот, могут быть добавлены в клетку-хозяина путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации или т.п., при этом добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки-хозяина или присутствовать в виде внехромосомного генетического материала (например, плазида или другой самореплицирующийся вектор). Понятие «гомологичный» или «гомолог» относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или виду активности, которые присутствуют или получены из клетки-хозяина, вида или штамма. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, может быть гомологичным нативному полинуклеотиду или гену и кодирует гомологичный полипептид или вид активности, но полинуклеотид или полипептид может иметь измененную структуру, последовательность, измененный уровень экспрессии или любую их комбинацию.

Неэндогенный полинуклеотид или ген, также как кодируемый полипептид или вид активности может иметь происхождение из одинаковых видов, различных видов или их комбинации.

В контексте настоящего описания понятие «эндогенный» или «нативный» относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или виду активности, которые в норме присутствуют в клетке-хозяине или у субъекта.

Понятие «экспрессия» в контексте настоящего описания относится к процессу, с помощью которого образуется полипептид на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, пост-транскрипционный контроль, пост-транскрипционную модификацию, трансляцию, пост-трансляционный контроль, пост-трансляционную модификацию или любую их комбинацию. Экспрессируемая молекула нуклеиновой кислоты, как правило, функционально связана с контролирующей экспрессию последовательностью (например, промотором).

Понятие «функционально связана» относится к ассоциации двух или большего количества молекул нуклеиновых кислот на одном фрагменте нуклеиновой кислоты таким образом, что на функцию одной влияет функция другой. Например, промотор функционально связан с кодирующей

последовательностью, если он обладает способностью влиять на экспрессию указанной кодирующей последовательности (т.е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора).

«Несвязанные» означает, что ассоциированные генетические элементы не находятся в тесной ассоциации друг с другом и функция одного не влияет на функцию другого.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 75% или более (т.е. на 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 80% или более (т.е. на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 85% или более (т.е. на 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в изобретении, содержит

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 90% или более (т.е. на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность,

идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах

осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

аминокислотную последовательность, идентичную на 95% или более (т.е. на 95% 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности.

В целом, антитела, представленные в настоящем описании, могут содержать одну или несколько дополнительных мутаций (помимо M428L и N434S) в Fc-области (например, в CH2- или CH3-участке). Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, не содержит какой-либо дополнительной мутации помимо M428L и N434S в его CH3-участке (в сравнении с соответствующим CH3-участком дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, не содержит какой-либо дополнительной мутации помимо M428L и N434S в его Fc-области (в сравнении с соответствующей Fc-областью дикого типа). В контексте настоящего описания понятие «дикий тип»

относится к референс-последовательности, например, встречающейся в естественных условиях. В качестве конкретного примера понятие «дикий тип» может относиться к последовательности, наиболее часто встречающейся в естественных условиях.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое можно применять в фармацевтических композициях и способах, представленных в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая содержит или состоит из аминокислотной
10 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Например, антитело, представленное в настоящем описании, может иметь тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленную в SEQ ID NO: 10.

15 Под объем изобретения подпадают также варианты антител. Таким образом, под объем изобретения подпадают также и варианты последовательностей, указанных в настоящем описании. Указанные варианты включают встречающиеся в естественных условиях варианты, образовавшиеся в результате соматической мутации *in vivo* в процессе иммунного ответа или *in*
20 *vitro* при культивировании immortalized клонов В-клеток. Альтернативно этому, варианты могут возникать в результате вырожденности генетического кода или вследствие ошибок при транскрипции или трансляции.

Нуклеиновые кислоты

Другим объектом изобретения является также молекула нуклеиновой
25 кислоты, содержащая полинуклеотид, который кодирует антитело, представленное в настоящем описании, или его часть. Примеры молекул нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидов включают, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулу РНК, такую как молекула рРНК, мРНК, miРНК, siРНК или тРНК, или молекулу ДНК, такую
30 как кДНК. Нуклеиновые кислоты могут кодировать легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела, представленного в настоящем описании. Иными словами, легкая цепь и тяжелая цепь антитела могут кодироваться одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты (например, бицистронно). Альтернативно этому, легкая

цепь и тяжелая цепь антитела могут кодироваться различными молекулами нуклеиновых кислот.

С учетом избыточности генетического кода настоящее описание включает также варианты последовательностей нуклеотидных последовательностей, которые кодируют одни и те же аминокислотные последовательности. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Полинуклеотид, кодирующий антитело (или полную молекулу нуклеиновой кислоты), можно оптимизировать для экспрессии антитела в клетке-хозяине. Например, оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности можно применять для повышения эффективности трансляции в экспрессионных системах, предназначенных для получения антитела. Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичные элементы (т.е. элементы, которые в естественных условиях не встречаются в той же самой молекуле нуклеиновой кислоты, что и кодирующая последовательность (тяжелой или легкой цепи) антитела). Например, молекула нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичный промотор, гетерологичный энхансер, гетерологичную UTR (например, для оптимальной трансляции/экспрессии), гетерологичный поли-А-хвост и т.п.

Некоторые версии нуклеотидных последовательностей могут включать также интрон(ы) в том случае, если интрон(ы) можно удалять с помощью ко- или пост-трансляционных механизмов. Различные нуклеотидные последовательности могут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода или в результате сплайсинга или обоих механизмов.

Молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, содержащую компоненты нуклеиновой кислоты. Понятие молекула нуклеиновой кислоты, как правило, относится к молекулам ДНК (включая кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК) или РНК, любая из которых может быть одноцепочечной или двухцепочечной. В случае наличия одной цепи молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой кодирующую цепь или не кодирующую (антисмысловую цепь). Полинуклеотиды (включая

олигонуклеотиды) и их фрагменты можно создавать, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или с помощью трансляции *in vitro*, или создавать с помощью любого из следующих механизмов действия, таких как встраивание путем лигирования, расщепление, с помощью эндонуклеазной активности или экзонуклеазной активности. Понятие «молекула нуклеиновой кислоты» можно применять в виде синонима понятию «полинуклеотид», т.е. молекула нуклеиновой кислоты может состоять из полинуклеотида, кодирующего антитело. Альтернативно этому, молекула нуклеиновой кислоты может содержать также дополнительные элементы помимо полинуклеотида, кодирующего антитело. Как правило, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полимер, содержащий или состоящий из нуклеотидных мономеров, которые ковалентно связаны друг с другом посредством фосфодиэфирных связей сахарно/фосфатного каркаса. Понятие «молекула нуклеиновой кислоты» включает также модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекулы ДНК или РНК с модифицированными основаниями, модифицированными сахарами или модифицированным каркасом и т.д.

Например, молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотиды, содержащие встречающиеся в естественных условиях субъединицы (например, пуриновые или пиримидиновые основания) и/или не встречающиеся в естественных условиях субъединицы (например, морфолиновое кольцо). Пуриновые основания включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, а пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Мономеры нуклеиновой кислоты могут быть сцеплены фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирной связи включают фосфоротриат, фосфородитриат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотриат, фосфоранилидат, фосфорамидат или т.п.

Молекулу нуклеиновой кислоты можно подвергать манипуляциям, встраивая, изымая путем делеции или изменяя некоторые нуклеотидные последовательности. Изменения в результате указанной манипуляции включают (но, не ограничиваясь только ими) изменения для интродукции сайтов рестрикции, для коррекции предпочтения кодонов, для добавления или оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных

последовательностей и т.д. Можно также изменять нуклеиновую кислоту для изменения кодируемых аминокислот. Например, может оказаться ценным интродуцировать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в аминокислотную последовательность антитела. Указанные точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, аффинность связывания антигена, пост-трансляционные модификации, иммуногенность и т.д., можно интродуцировать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или можно интродуцировать метки (например, для целей очистки). Альтернативно этому, мутация нуклеотидной последовательности может быть «молчащей», т.е. не проявляться в аминокислотной последовательности из-за избыточности генетического кода. В целом, мутации можно интродуцировать в конкретные сайты или можно интродуцировать случайным образом с последующей селекцией (например, молекулярная эволюция). Например, одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих любые легкие или тяжелые цепи (приведенного в качестве примера) антитела, представленного в настоящем описании, можно подвергать случайной или направленной мутации для придания различных свойств кодируемым аминокислотам. Указанные изменения могут приводить к итерационному процессу, при котором начальные изменения могут сохраняться, а новые изменения могут интродуцироваться в других нуклеотидных положениях. Кроме того, можно объединять изменения, полученные на независимых стадиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (или (полная) молекула нуклеиновой кислоты), может иметь оптимизированные кодоны. Специалисту в данной области известны различные инструменты для оптимизации кодонов, например, описанные у: Ju Xin Chin, Bevan Kai-Sheng Chung, Dong-Yup Lee, Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design, Bioinformatics, т. 30, выпуск 15, 1 августа 2014 г., сс. 2210–2212; или у: Grote A., Hiller K., Scheer M., Munch R., Nortemann B., Hempel D.C., Jahn D., JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. Nucleic Acids Res. 1 июля 2005 г. 33 (издание Web Server):W526-31; или, например, представленные в

алгоритме OptimumGeneTM фирмы Genscript (описан в US 2011/0081708 A1); или в GeneArt Gene Synthesis Tool (фирма Thermo Fisher Scientific).

Последовательности с оптимизированными кодонами включают

последовательности с частично оптимизированными кодонами (в которых по
5 меньшей мере один кодон оптимизирован для экспрессии в клетке-хозяине) и последовательности с полностью оптимизированными кодонами.

В настоящем изобретении предложена также комбинация первой и второй молекул нуклеиновых кислот, в которой первая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, представленного

10 в настоящем описании; а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий соответствующую легкую цепь того же антитела.

Указанное выше описание, касающееся (основных) особенностей молекулы нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем описании, применимо
15 соответственно к первой и второй молекулам нуклеиновых кислот, входящих в комбинацию. Например, один или оба полинуклеотида, который/которые кодирует(ют) тяжелую(ые) и/или легкую(ие) цепь(и) антитела представляет(ют) собой полинуклеотид(ы) с оптимизированными кодонами.

В контексте настоящего описания нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность, «имеющая происхождение» из заданной
20 нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к источнику нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Нуклеотидная

последовательность или аминокислотная последовательность, которая имеет происхождение из конкретной последовательности, может иметь
аминокислотную последовательность, практически идентичную

25 последовательности или ее части, из которой она имеет происхождение, при этом «практически идентичная» включает варианты последовательности, указанные выше. Нуклеотидная последовательность или аминокислотная

последовательность, которая имеет происхождение из конкретного пептида или белка, может иметь происхождение из соответствующего домена в конкретном
30 пептиде или белке. В этом контексте «соответствующий» относится к наличию одинаковых представляющих интерес функциональностей или характеристик.

Таким образом, «соответствующие» части пептидов, белков и нуклеиновых кислот легко может идентифицировать обычный специалист в данной области.

Аналогично этому, последовательность, «имеющую происхождение» из другой (например, «исходной») последовательности, обычный специалист в данной области может идентифицировать как имеющую свой источник происхождения в исходной последовательности.

5 Вектор

Под объем изобретения подпадают также векторы, например, экспрессионные векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем описании. Как правило, вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше.

10 В настоящем описании предложена также комбинация первого и второго векторов, в которой первый вектор содержит первую молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше (для комбинации молекул нуклеиновых кислот), а второй вектор содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше (для комбинации молекул нуклеиновых кислот).

15 Вектор, как правило, представляет собой рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, т.е. молекулу нуклеиновой кислоты, которая не встречается в естественных условиях. Таким образом, вектор может содержать гетерологичные элементы (т.е. элементы последовательности, отличающиеся от встречающихся в природе). Например, вектор может содержать сайт

20 множественного клонирования, гетерологичный промотор, гетерологичный энхансер, гетерологичный маркер селекции (для идентификации клеток, содержащих указанный вектор, по сравнению с клетками, которые не содержат указанный вектор) и т.п. Вектор в контексте настоящего описания можно применять для включения или укрытия требуемой нуклеотидной

25 последовательности. Указанные векторы могут представлять собой векторы для хранения, экспрессионные векторы, клонирующие векторы, векторы для переноса и т.д. Вектор для хранения представляет собой вектор, который обеспечивает удобное хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Так, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например (тяжелой

30 и/или легкой цепи) требуемому антителу, представленному в настоящем описании. Экспрессионный вектор можно применять для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например, мРНК, или пептидов, полипептидов или белков. Например, экспрессионный вектор может содержать

последовательности, необходимые для транскрипции сегмента последовательности вектора, такие как (гетерологичная) промоторная последовательность. Клонировующий вектор, как правило, представляет собой вектор, который содержит сайт клонирования, который можно применять для включения нуклеотидных последовательностей в вектор. Клонировующий вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или вектор на основе бактериофага. Вектор для переноса может представлять собой вектор, который можно применять для переноса молекул нуклеиновых кислот в клетки или организмы, например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего описания может представлять собой, например, РНК-вектор или ДНК-вектор. Например, вектор в контексте настоящего описания содержит сайт клонирования, маркер для селекции, такой как фактор устойчивости к антибиотикам, и последовательность, которую можно применять для размножения вектора, такую как сайт инициации репликации. Вектор в контексте настоящего описания может представлять собой плазмидный вектор.

Клетки

Следующим объектом настоящего изобретения являются также клетки, экспрессирующие антитело, представленное в настоящем описании; и/или содержащие вектор, представленный в настоящем описании.

Примеры таких клеток включают (но, не ограничиваясь только ими) эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, клетки животных, клетки насекомых или клетки растений, или прокариотические клетки, например, *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки представляют собой клетки млекопитающих. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения клетки представляют собой линию клеток млекопитающих, таких как CHO-клетки (например, клетки DHFR-CHO (Urlaub и др., PNAS 77, 1980, с. 4216, CHO-KSV, ExpiCHO), клетки почки человеческого эмбриона (например, клетки HEK293T), клетки PER.C6, клетки Y0, клетки Sp2/0, клетки NS0, клетки печени человека, например, клетки Нера RG, клетки миеломы или клетки гибридомы. Другие примеры линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки Сертоли мыши (например, клетки TM4); линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную с помощью OB40 (COS-7); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76);

клетки почки обезьяны (CV1); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI; клетки MRC 5 и клетки FS4.

- 5 Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

- 10 В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*. Экспрессия пептидов в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, хорошо известна (см., например, Pluckthun A. *Bio/Technology* 9, 1991, сс. 545-551). Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не являются необходимыми. Сведения об экспрессии антител в бактериях см., например, в US №№ 5648237; 5789199 и 5840523.
- 15

- Клетки насекомых, которые можно применять для экспрессии антитела, представленного в настоящем описании, известны в данной области и включают, например, клетки *Spodoptera frugiperla* Sf9, клетки *Trichoplusia ni* BTI-TN5B1-4 и клетки *Spodoptera frugiperla* SfSWT01 «MimicTM» (см., например, Palmberger и др., *J. Biotechnol.* 153(3-4), 2011, сс. 160-166). Идентифицированы многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно применять в сочетании с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.
- 20

- Эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, также являются приемлемыми хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих белки векторов, и они включают штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).
- 25
- 30

Клетки растений можно применять также в качестве хозяев для экспрессии антитела, представленного в настоящем описании. Например, в технологии

PLANTIBODIESTM (описанной, например, в US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429) применяют трансгенные растения для получения антител.

Для получения описанных антител можно использовать любую систему экспрессии белков, которая является приемлемой согласно настоящему

5 описанию. Приемлемые системы экспрессии включают трансгенных животных, которые описаны в Gene Expression Systems, изд-во Academic Press, под ред. Fernandez и др., 1999.

В конкретных вариантах осуществления изобретения клетку можно трансфектировать вектором, представленным в настоящем описании, например, 10 экспрессионным вектором. Понятие «трансфекция» относится к интродукции молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, например, в эукариотические или прокариотические клетки. В контексте настоящего описания понятие «трансфекция» включает любой известный специалисту в данной области метод интродукции молекул 15 нуклеиновых кислот в клетки, такие как эукариотические клетки, например, клетки млекопитающих. Такие методы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов или трансфекцию на основе катионных полимеров, таких как 20 ДЭАЭ-декстран или полиэтиленимин, и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения интродукция является невирусной.

Кроме того, клетки, представленные в настоящем описании, можно трансфектировать стабильно или кратковременно вектором, представленным в настоящем описании, например, для экспрессии антитела, представленного в 25 настоящем описании. В указанных вариантах осуществления изобретения клетки стабильно трансфектируют вектором, указанным в настоящем описании, который кодирует связывающий белок. Альтернативно этому, клетки можно кратковременно трансфектировать вектором, представленным в настоящем описании, который кодирует антитело, представленное в настоящем описании. В 30 любом из описанных вариантов осуществления изобретения полинуклеотид может быть гетерологичным относительно клетки-хозяина.

В родственных объектах изобретения предложены способы получения антитела, где способы включают культивирование клетки-хозяина,

представленной в настоящем описании, в условиях и в течение времени, достаточных для получения антитела.

Таким образом, в настоящем описании предложена также рекомбинантная клетка-хозяин, которая гетерологично экспрессирует антитело, представленное в настоящем описании. Например, клетка может представлять собой клетку другого вида по сравнению с видом, из которого полностью или частично получено антитело (например, СНО-клетки, экспрессирующие человеческое антитело или сконструированное человеческое антитело). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка относится к типу клеток, которые не экспрессируют антитело в естественных условиях. Кроме того, клетка-хозяин может придавать связывающему белку пост-трансляционную модификацию (РТМ; например, гликозилирование или фукозилирование), которая отсутствует в естественном состоянии связывающего белка (или в нативном состоянии родительского связывающего белка, из которого рассматриваемый связывающий белок сконструирован или получен). Указанная РТМ может приводить к функциональному отличию (например, пониженной иммуногенности). Таким образом, связывающий белок, представленный в настоящем описании, продуцируемый клеткой-хозяином, представленной в настоящем описании, может иметь одну или несколько пост-трансляционных модификаций, которая(ые) отличает(ют) его от связывающего белка или родительского связывающего белка в его нативном состоянии (например, человеческое антитело, полученное в СНО-клетке, может содержать пост-трансляционную модификацию, которая отличает его от антитела, выделенного из организма человека и/или продуцированного нативной человеческой В-клеткой или плазматической клеткой).

Получение антител

Антитела, которые можно применять в фармацевтических композициях и способах, указанных в настоящем описании, можно создавать с помощью любого метода, известного в данной области. Например, хорошо известна общая методология создания моноклональных антител с использованием технологии гибридом (Kohler G. и Milstein C., 1975; Kozbar и др., 1983). В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют альтернативный метод иммортализации с использованием EBV, описанный в WO 2004/076677.

В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют метод, описанный в WO 2004/076677, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. При осуществлении этого метода В-клетки, продуцирующие антитело, представленное в настоящем описании, трансформируют EBV и активатором поликлональных В-клеток. Необязательно в процессе стадии трансформации можно добавлять также стимуляторы клеточного роста и дифференцировки для дополнительного повышения эффективности. Эти стимуляторы могут представлять собой цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В одном из объектов изобретения IL-2 добавляют в процессе стадии иммортализации для дополнительного повышения эффективности иммортализации, но его применение не является необходимым. Полученные с помощью этих методов иммортиализованные В-клетки можно затем культивировать с использованием методов, известных в данной области, и выделять из них антитела.

Другой приведенный в качестве примера метод описан в WO 2010/046775. При осуществлении этого метода культивируют плазматические клетки в ограниченном количестве или в виде единичных плазматических клеток в микролуночных культуральных планшетах. Антитела можно выделять из культур плазматических клеток. Кроме того, из культур плазматических клеток можно экстрагировать РНК и осуществлять ПЦР с использованием известных в данной области методов. VH- и VL-области антител можно амплифицировать с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенировать и клонировать в экспрессионном векторе, которым затем трансфектировать НЕК293Т-клетки или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессионных векторах, трансфекцию клеток-хозяев, культивирование трансфектированных клеток-хозяев и выделение полученного антитела можно осуществлять с использованием любых методов, известных специалисту в данной области.

Антитела можно при необходимости дополнительно очищать, используя фильтрацию, центрифугирование и различные хроматографические методы, такие как ЖХВР или аффинная хроматография. Методики очистки антител, например, моноклональных антител, включая методики получения имеющих фармацевтическую чистоту антител, хорошо известны в данной области.

Для получения последовательностей ДНК, которые кодируют антитела, представленные в настоящем описании, можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Требуемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости можно применять методы сайтнаправленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Любую приемлемую систему клетка-хозяин /вектор можно применять для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антител, представленные в настоящем описании. Системы экспрессии на основе эукариотических клеток, например, клеток млекопитающих, в качестве клеток-хозяев, можно применять для получения молекул антител, таких как молекулы полных антител. Приемлемые клетки млекопитающих, применяемые в качестве хозяев, включают указанные в настоящем описании клетки, такие как (но, не ограничиваясь только ими) клетки CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, миеломы или гибридомы.

В настоящем описании предложен также процесс получения молекулы антитела, которую можно включать в фармацевтические композиции и способы, указанные в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретения процесс включает культивирование (гетерологичной) клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту, представленную в настоящем описании, в условиях, приемлемых для экспрессии белка с ДНК, которая кодирует молекулу антитела, представленную в настоящем описании, и выделение молекулы антитела.

Для получения антитела, которое содержит тяжелые и легкие цепи, клеточную линию можно трансфектировать двумя векторами, первым вектором, который кодирует полипептид легкой цепи, и вторым вектором, который кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно этому, можно использовать один вектор, который представляет собой вектор, включающий последовательности, которые кодируют полипептид легкой цепи и полипептид тяжелой цепи.

Антитела, указанные в настоящем описании, можно получать путем (I) экспрессии нуклеотидной последовательности, представленной в настоящем описании, в клетке-хозяине, например, с использованием вектора,

представленного в настоящем описании, и (II) выделения продукта экспрессии в виде антитела. Дополнительно метод может включать (III) очистку выделенного антитела. Трансформированные В-клетки и культивируемые плазматические клетки можно подвергать скринингу в отношении их способности

5 продуцировать антитела с требуемой специфичностью или функцией.

Стадию скрининга можно осуществлять с использованием любого иммуноанализа, например, ELISA, путем окрашивания тканей или клеток (включая трансфектированные клетки), путем анализа нейтрализации или
10 любого из многочисленных других методов, известных в данной области, предназначенных для идентификации требуемой специфичности или функции. Анализ можно выбирать на основе только распознавания одного или нескольких антигенов или можно выбирать на основе дополнительных требований, включающих требуемую функцию и т.д., для отбора нейтрализующих антител, а не просто связывающихся с антигеном антител, для отбора антител, которые
15 могут изменять характеристики клеток-мишеней, такие как их каскады передачи сигналов, их форма, их скорость роста, их способность воздействовать на другие клетки, их ответ на воздействие других клеток или других реагентов или на изменение условий, их статус дифференцировки и т.д.

Затем можно получать индивидуальные клоны трансформированных В-
20 клеток из позитивной трансформированной В-клеточной культуры. Стадию клонирования для выделения индивидуальных клонов из смеси позитивных клеток можно осуществлять с использованием серийного разведения, микроманипуляции, отбора единичной клетки с помощью сортировки клеток или другого метода, известного в данной области.

25 Нуклеиновую кислоту из культивируемых плазматических клеток можно выделять, клонировать и экспрессировать в НЕК293Т-клетках или других известных клетках-хозяевах с использованием методов, известных в данной области.

Клоны иммортализованных В-клеток или трансфектированные клетки-
30 хозяева, представленные в настоящем описании, можно использовать различными путями, например, в качестве источника моноклональных антител, в качестве источника нуклеиновой кислоты (ДНК или мРНК), кодирующей представляющее интерес моноклональное антитело, для исследований и т.д.

В изобретении предложена также композиция, содержащая иммортализованные В-клетки памяти или трансфектированные клетки-хозяева, которые продуцируют антитела, представленные в настоящем описании.

Клон иммортализованных В-клеток или культивируемые плазматические клетки, представленные в настоящем описании, можно использовать также в качестве источника нуклеиновой кислоты для клонирования генов антител для последующей рекомбинантной экспрессии. Экспрессия из рекомбинантных источников может быть более приемлемой для фармацевтических целей по сравнению с экспрессией из В-клеток или гибридом, например, с позиции стабильности, воспроизводимости, простоты культивирования и т.д.

Таким образом, в настоящем описании предложен также способ получения рекомбинантной клетки, включающий стадии, на которых (I) получают одну или несколько нуклеиновых кислот (например, мРНК для тяжелой и/или легкой цепи) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которая(ые) кодирует(ют) представляющее интерес антитело; (II) встраивают нуклеиновую кислоту в экспрессионный вектор и (III) трансфектируют вектором (гетерологичную) клетку-хозяина для обеспечения экспрессии представляющего интерес антитела в указанной клетке-хозяине.

Аналогично этому, в настоящем описании предложен также способ получения рекомбинантной клетки, включающий стадии, на которых: (I) секвенируют нуклеиновую(ые) кислоту(ы) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которая(ые) кодирует(ют) представляющее интерес антитело; и (II) используют информацию о последовательностях, полученную на стадии (I), для получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) для инсерции в клетку-хозяина для обеспечения экспрессии представляющего интерес антитела в указанной клетке-хозяине. Нуклеиновую кислоту можно, но это не является обязательным, подвергать манипуляциям между стадиями (I) и (II) для интродукции сайтов рестрикции, для изменения предпочтения кодонов и/или для оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных последовательностей.

Кроме того, в настоящем описании предложен также способ получения трансфектированной клетки-хозяина, включающий стадию трансфекции клетки-хозяина одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, которые кодируют

представляющее интерес антитело, в котором нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеиновые кислоты, полученные из клона иммортализованных В-клеток или культивируемой плазматической клетки, представленных в настоящем описании. Указанные процедуры первоначального

5 получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) и последующего их применения для трансфекции клетки-хозяина могут осуществляться в различное время различными людьми и в различных местах (например, в различных странах).

Затем указанные рекомбинантные клетки, представленные в настоящем описании, можно применять для экспрессии и культивирования. Они являются

10 особенно ценными для экспрессии антител при крупномасштабном фармацевтическом производстве. Их можно применять также в качестве действующего вещества фармацевтической композиции. Можно применять любую приемлемую методику культивирования, включая (но, не ограничиваясь только ими) статическое культивирование, роллерное культивирование во

15 флаконах, культивирование в асцитной жидкости, культивирование в биореакторе с картриджем из полых волокон, культивирование в миниферментере модульного типа, культивирование в реакторе с мешалкой, культивирование на микроносителях, перфузионное культивирование с использованием керамического картриджа и т.д.

20 Методы получения и секвенирования генов иммуноглобулинов из В-клеток или плазматических клеток хорошо известны в данной области (например, см. главу 4 в Kuby Immunology, 4-ое изд., 2000).

Трансфектированная клетка-хозяин может представлять собой любую клетку-хозяина, указанную в настоящем описании, например, эукариотическую

25 клетку, включая клетки дрожжей и животных, прежде всего клетки млекопитающих (например, CHO-клетки, NS0-клетки, человеческие клетки, такие как PER.C6 или НКВ-11, клетки миеломы или клетки печени человека), а также клетки растений. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансфектированная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего,

30 например, клетку человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия в хозяевах может приводить к гликозилированию антитела, указанного в описании, прежде всего с помощью углеводных структур, которые сами не являются иммуногенными для человека. В некоторых вариантах

осуществления изобретения трансфектированная клетка-хозяин может расти в бессывороточных средах. В других вариантах осуществления изобретения трансфектированная клетка-хозяин может расти в культуре без присутствия продуктов животного происхождения. Трансфектированную клетку-хозяина можно также культивировать с получением клеточной линии.

В настоящем описании предложен также способ получения одной или нескольких молекул нуклеиновых кислот (например, генов тяжелых и легких цепей), которые кодируют представляющее интерес антитело, включающий стадии, на которых: (I) получают клон иммortalизованных В-клеток или культивируют плазматические клетки, представленные в настоящем описании; (II) получают из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющее интерес антитело. Кроме того, в настоящем описании предложен способ получения нуклеотидной последовательности, которая кодирует представляющее интерес антитело, включающий стадии, на которых: (I) получают клон иммortalизованных В-клеток или культивируют плазматические клетки, представленные в настоящем описании; (II) секвенируют полученную из клона иммortalизованных В-клеток или культивируемых плазматических клеток нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющее интерес антитело.

В настоящем описании предложен также способ получения молекулы(л) нуклеиновой(ых) кислоты(т), которая(ые) кодирует(ют) представляющее интерес антитело, включающий стадию получения нуклеиновой кислоты, которая имеет происхождение из клона трансфектированных В-клеток или культивируемых плазматических клеток, представленных в настоящем описании. При этом, процедуры первоначального получения клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток и последующего получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток могут осуществляться в разное время различными людьми и в различных местах (например, в различных странах).

В настоящем описании предложен также способ получения антитела (например, для фармацевтического применения), представленного в настоящем описании, включающий стадии, на которых: (I) получают и/или секвенируют одну или несколько нуклеиновых кислот (например, гены тяжелых и легких

цепей) из отобранного клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которые экспрессируют представляющее интерес антитело; (II) встраивают нуклеиновую(ые) кислоту(ы) в экспрессионный вектор или применяют нуклеотидную(ые) последовательность(и) для получения экспрессионного вектора; (III) трансфектируют клетку-хозяина, которая может экспрессировать представляющее интерес антитело; (IV) культивируют или субкультивируют трансфектированные клетки-хозяева в условиях, в которых происходит экспрессия представляющего интерес антитела; и необязательно (V) очищают представляющее интерес антитело.

В настоящем описании предложен также способ получения представляющего интерес антитела, включающий стадии, на которых: культивируют или субкультивируют популяцию трансфектированных клеток-хозяев, например, популяцию стабильно трансфектированных клеток-хозяев, в условиях, в которых происходит экспрессия представляющего интерес антитела, и необязательно очищают представляющее интерес антитело, в котором указанная популяция трансфектированных клеток-хозяев была создана путем (I) получения нуклеиновой(ых) кислоты(т), кодирующей(их) отобранное представляющее интерес антитело, которое получали с использованием клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, полученных согласно описанному выше методу, (II) встраивания нуклеиновой(ых) кислоты(т) в экспрессионный вектор, (III) трансфекции вектором клетки-хозяина, которая может экспрессировать представляющее интерес антитело, и (IV) культивирования или субкультивирования трансфектированной клетки-хозяина, включающей встроенные нуклеиновые кислоты, с получением представляющего интерес антитела. При этом, процедуры первоначального получения рекомбинантной клетки-хозяина и последующего ее культивирования для экспрессии антитела могут осуществляться в различное время различными людьми и в различных местах (например, в различных странах).

Фармацевтические композиции

В настоящем описании предложены фармацевтические композиции (понятия «фармацевтическая композиция» и «композиция антитела» в настоящем описании применяют взаимозаменяемо), содержащие антитело, которое нейтрализует вирус гриппа А, и фармацевтически приемлемый водный

наполнитель. Под наполнителем, как правило, подразумевают материал, который является приемлемым для хранения, транспортировки, разработки рецептуры и/или введения соединения, такого как фармацевтически активное соединение, в частности антител, представленных в настоящем описании.

- 5 Например, наполнитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, пригодную для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, в частности антител, представленных в настоящем описании.

- 10 Фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, приготавливают для инъекции или инфузии пациенту (которого в настоящем описании обозначают также как субъект, в том числе в контексте профилактического введения). В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию можно приготавливать для внутривенной, внутриартериальной или внутривентрикулярной инфузии. В других
- 15 вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию можно приготавливать для внутривенной, внутриартериальной, внутривентрикулярной, интратекальной, внутримышечной, подкожной инъекции. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию приготавливают для внутримышечной («IM»)
- 20 инъекции. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, представляют собой фармацевтически приемлемые стерильные водные растворы, обладающие приемлемым значением pH, изотоничностью и стабильностью для введения человеку. Водные наполнители, которые можно применять для приготовления
- 25 фармацевтических композиций, указанных в описании, включают воду (например, стерильную воду, воду для инъекций USP-класса), а также изотонические наполнители, такие, например, хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактированный раствор Рингера для инъекций.

- 30 Фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, включают антитело, выбранное из нейтрализующих вирус гриппа А антител, представленных в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее последовательности

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; и мутации M428L и N434S (согласно EU-нумерации) в константной области тяжелой цепи. В других вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности (последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно). В других вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 75% или более (т.е. на 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В следующих вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 80% или более (т.е. на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей

мере на 80% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В следующих вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая

5 содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 85% или более (т.е. на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-

10 последовательности. В следующих вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают (выделенное) антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 90% или более (т.е. на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

15 более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в описании, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит

20 аминокислотную последовательность, идентичную на 95% или более (т.е. на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В других вариантах осуществления изобретения

25 фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются

30 указанные выше CDR-последовательности.

В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, включают антитело, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную

в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, имеет величину IC₉₀, которая характеризует ингибирование *in vitro* инфекции, вызываемой вирусом гриппа, составляющую примерно 2,17 мкг/мл.

Фармацевтические композиции включают продукт в виде антитела в количестве, достаточном для обеспечения введения антитела пациенту в терапевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело включают в концентрации, выбранной из 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл и 200 мг/мл. В других вариантах осуществления изобретения антитело включают в фармацевтическую композицию в концентрации, выбранной из концентрации, превышающей 50 мг/мл, превышающей 75 мг/мл, превышающей 100 мг/мл, превышающей 125 мг/мл, превышающей 150 мг/мл, превышающей 175 мг/мл, превышающей 200 мг/мл, превышающей 225 мг/мл, превышающей 250 мг/мл. В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, находящейся в диапазоне от 50 мг/мл до 200 мг/мл, находящейся в диапазоне от 75 мг/мл до 225 мг/мл, или находящейся в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, находящейся в диапазоне от 125 мг/мл до 150 мг/мл. В следующих вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут включать один или несколько компонентов, таких как буфер, поверхностно-активное вещество или блок-сополимер, соль и стабилизатор (такой стабилизатор как сахарный спирт, дисахарид или полисахарид и/или стабилизирующую аминокислоту). Кроме того, при необходимости или по желанию фармацевтические композиции, указанные в описании, можно приготавливать с дополнительным включением одного или нескольких антиоксидантов (например, аскорбиновой кислоты, метионина, этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA)).

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, имеют и поддерживают значение рН, при котором сохраняется жизнеспособность антитела, и при этом являются приемлемыми для инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции, указанные в описании, как правило, имеют значение рН в диапазоне от примерно 5,5 до примерно 6,5, например, в диапазоне от 5,5 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от 5,8 до 6,2, например, примерно 6,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение рН может составлять 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5.

Фармацевтическая композиция может включать забуферивающий агент для достижения и поддержания требуемого рН. Буферы, которые можно применять в фармацевтических композициях, указанных в описании, включают, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный и гидроксиметиламинометановый (Трис) буферы. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция включает буфер, выбранный из гистидинового буфера и фосфатного буфера. В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидин можно включать в композицию в концентрации, находящейся в диапазоне от 10мМ до 40мМ, или находящейся в диапазоне 20мМ до 40иМ. Например, в конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, представленная в настоящем описании, включает гистидин в концентрации, выбранной из 10мМ, 15мМ, 20мМ, 25мМ, 30мМ, 35мМ или 40мМ. В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, находящейся в диапазоне от 120 мг/мл до 160 мг/мл (например, 120 мг/мл, 125 мг/мл, 130 мг/мл, 135 мг/мл, 140 мг/мл, 145 мг/мл, 150 мг/мл, 155 мг/мл или 160 мг/мл), и фармацевтическая композиция содержит гистидин в концентрации 20мМ, 25мМ, 30мМ, 35мМ или 40мМ. В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации примерно 75 мг/мл и содержит гистидин в концентрации примерно 10мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения представленная в настоящем описании фармацевтическая композиция, содержащая гистидиновый буфер, имеет значение рН, составляющее от 5,5 до 6,5, предпочтительно от 5,8 до 6,2,

например 6. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция имеет рН 6 и включает гистидиновый буфер.

Фармацевтические композиции, указанные в описании, могут включать также поверхностно-активное вещество или трехблочный сополимер.

- 5 Поверхностно-активные вещества, которые иногда называют «детергентами», могут обладать одной или несколькими функциями. Например, в водных растворах антител поверхностно-активные вещества способствуют сохранению функциональности антитела, растворению антитела или других эксципиентов и/или их функция состоит в контроле роста микроорганизмов. Поверхностно-
- 10 активные вещества, которые можно применять в фармацевтических композициях, указанных в описании, включают, например, полисорбат 80 (Твин 80), полисорбат 20 (Твин 20) и полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция включает
- 15 поверхностно-активное вещество в концентрации, находящейся в диапазоне от 0,01% до 0,05% (мас./об.) (например, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04% или 0,05%). В указанных вариантах осуществления изобретения поверхностно-активное вещество можно выбирать из полисорбата 80 (Твин 80), полисорбата 20 (Твин 20) и полоксамера 188. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, включает полисорбат 80
- 20 (Твин 80) или полоксамер 188 в концентрации, находящейся в диапазоне от 0,01% до 0,05% (мас./об.). В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в настоящем описании, включает полисорбат 80 (Твин 80) или полоксамер 188 в концентрации 0,02% (мас./об.).

- Если фармацевтические композиции, представленные в настоящем
- 25 описании, включают в качестве стабилизатора сахарный спирт, дисахарид или полисахарид, то стабилизатор можно выбирать, например, из маннита, сорбита, сахарозы, трегалозы и декстрана 40. В конкретных вариантах осуществления изобретения стабилизатор представляет собой дисахарид. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция включает
- 30 дисахарид в концентрации, находящейся в диапазоне от 3,0% до 9,0% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 3,6% до 8,6%, более предпочтительно в диапазоне от 4% до 6%, например, в диапазоне от 4,3% до 6,3%, например, 5,3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения дисахарид представляет

с собой сахарозу. В некоторых из указанных вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция включает сахарозу в концентрации 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7%, 3,8%, 3,9%, 4,0%, 4,1%, 4,2%, 4,3%, 4,4%, 4,5%, 4,6%, 4,7%, 4,8%, 4,9%, 5,0%, 5,1%, 5,2%, 5,3%, 5,4%, 5,5%, 5,6%, 5,7%, 5,8%, 5,9%, 6,0%, 6,1%, 6,2%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,6%, 6,7%, 6,8%, 6,9%, 7,0%, 7,1%, 7,2%, 7,3%, 7,4%, 7,5%, 7,6%, 7,7%, 7,8%, 7,9%, 8,0%, 8,1%, 8,2%, 8,3%, 8,4%, 8,5%, 8,6%, 8,7%, 8,8%, 8,9% или 9,0% (мас./об.), или находится в пределах диапазона, ограниченного и включающего любые два из этих значений. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция включает сахарозу в концентрации 5,3% (мас./об.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции адаптируют для введения млекопитающему, например, человеку. В указанных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция является стерильной и ее можно специально приготавливать в виде свободной от пирогенов композиции. Кроме того, фармацевтическая композиция может быть изотоничной (плазме крови) человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции не должны иметь значение pH ниже чем 5,5. В некоторых других вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции не должны содержать ацетат или цитрат. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции не должны содержать соль, в конкретных вариантах осуществления изобретения, такую как NaCl. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции не должны иметь высокую ионную силу. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции не должны (I) содержать фосфатный буфер и (II) иметь pH 7 или выше.

Фармацевтические композиции, указанные в описании, можно приготавливать для непосредственного введения субъекту (т.е. без стадии восстановления или смешения) или их можно приготавливать в виде лиофилизированного продукта, подлежащего восстановлению в водном наполнителе перед инъекцией или инфузией субъекту. Для непосредственного введения субъекту фармацевтическую композицию, представленную в

настоящем описании, можно получать, например, в предварительно заполненном шприце или во флаконе, таком как стеклянный флакон. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные в описании фармацевтические композиции поставляют в герметически запечатанных контейнерах. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции могут находиться в форме набора, созданного так, чтобы объединенную композицию восстанавливать перед введением субъекту. Например, лиофилизированное антитело можно поставлять в форме набора со стерильной водой или стерильным буфером.

Медицинское лечение и применения

Следующим объектом настоящего изобретения является применение фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А. В конкретных вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, где способы включают: введение субъекту, который нуждается в этом, в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используют различные фармакокинетические («ФК») параметры для описания или характеристики способов и фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании. В контексте настоящего описания ФК-параметры, на которые сделаны ссылки в способах, представленных в настоящем описании, получают с использованием стандартного некомпартментального метода, заложенного в программное обеспечение WinNonlin® 8.2 (фирма Certara L.P., Принстон, шт. Нью-Джерси). Дополнительные подробности, касающиеся получения концентраций антитела в сыворотке для цели оценки ФК параметров, описаны в связи с клиническим исследованием на людях, упомянутым в примере 7.

Понятие « $t_{1/2}$ » относится к времени полувыведения антитела, включенного в фармацевтическую композицию, которую вводят субъекту. Понятие « C_{last} », как правило, относится к последней поддающейся измерению концентрации в плазме (т.е. после измерения которой субстанция не присутствует в плазме в поддающихся измерению концентрациях). В контексте настоящего описания

«C_{last}» относится к концентрации в плазме, измеренной в день 140 после введения фармацевтической композиции.

Профилактика инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, относится, прежде всего, к профилактическим мероприятиям, если у субъекта не

5 диагностирована инфекция, вызываемая вирусом гриппа А (либо диагностирование не осуществляли, либо результаты диагностирования были отрицательными), и/или у субъекта не проявляются симптомы инфекции, вызываемой вирусом гриппа А. Профилактика инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, является особенно важной для субъектов, имеющих при заражении

10 повышенный риск серьезного заболевания или осложнений, таких как беременные женщины, дети (например дети возрастом менее 59 месяцев), престарелые люди, субъекты с хроническими медицинскими состояниями (такими как сердечно-сосудистые, легочные, почечные, метаболические, нервно-психические, печеночные или гематологические заболевания) и субъекты с

15 иммуносупрессивными состояниями (такими как ВИЧ /СПИД, получающие химиотерапию или стероиды, или со злокачественными заболеваниями). Кроме того, профилактика инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, является особенно важной для субъектов, имеющих повышенный риск заражения вирусом гриппа А, например, в результате повышенного контакта, например, субъектов,

20 работающих или находящихся в общественных местах, в частности, медицинских работников.

В отличие от этого, в случае терапевтических мероприятий субъект, как правило, инфицирован вирусом гриппа А, у него диагностирована инфекция, вызываемая вирусом гриппа А, и/или проявляются симптомы инфекции,

25 вызываемой вирусом гриппа А. Следует отметить, что понятия «лечение» и «терапия»/«терапевтические мероприятия» в отношении инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, включают (полное) излечение, а также ослабление/уменьшение инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, или связанных с ней симптомов (например, ослабление /снижение серьезности

30 инфекции и/или симптомов, количества симптомов, продолжительности инфекции и/или симптомов или любой их комбинации).

Способы, указанные в настоящем описании, включают способы лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, у субъектов, у которых

диагностирована инфекция, вызываемая вирусом гриппа А, или у субъектов, у которых проявляются симптомы инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом способы включают введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах способов, предназначенных для лечения субъектов, у которых диагностированы или обнаружены симптомы гриппа А, после введения фармацевтической композиции у субъекта обнаружено (I) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких респираторных симптомов, выбранных из кашля, боли в горле, ринореи и заложенности носа, и/или (II) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких системных симптомов, выбранных из лихорадки, озноба, миалгии, головной боли, недомогания и усталости. Для целей настоящего описания и описания представленных способов понятие «лихорадка» относится к температуре в ротовой полости $>38^{\circ}\text{C}$ ($100,4^{\circ}\text{F}$).

Способы, представленные в настоящем описании, включают способы профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, у субъекта, при этом способы включают введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах способов профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, после введения фармацевтической композиции у субъекта обнаружено (I) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких респираторных симптомов, выбранных из кашля, боли в горле, ринореи и заложенности носа, и/или (II) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких системных симптомов, выбранных из лихорадки, озноба, миалгии, головной боли, недомогания и усталости, по меньшей мере в течение 4 недель после введения фармацевтической композиции. В других вариантах способа профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, после введения фармацевтической композиции у субъекта обнаружено (I) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких респираторных симптомов, выбранных из кашля, боли в горле, ринореи и заложенности носа, и/или (II) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких системных симптомов, выбранных из лихорадки, озноба, миалгии, головной боли, недомогания и усталости, по

меньшей мере в течение 12 недель после введения фармацевтической композиции. В следующих вариантах способа профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, после введения фармацевтической композиции у субъекта обнаружено (I) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких респираторных симптомов, выбранных из кашля, боли в горле, ринореи и заложенности носа, и/или (II) уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких системных симптомов, выбранных из лихорадки, озноба, миалгии, головной боли, недомогания и усталости, по меньшей мере в течение 20 недель после введения фармацевтической композиции. В некоторых вариантах способа профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанного в настоящем описании, введение субъекту фармацевтической композиции предусматривает только одно единственное введение фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве в сезон. В некоторых вариантах осуществления изобретение введение фармацевтической композиции обеспечивает субъекту системную экспозицию нейтрализующего антитела против вируса гриппа А, представленного в настоящем описании, в течение периода времени, выбранного по меньшей мере из 10 недель, по меньшей мере 15 и по меньшей мере 20 недель после однократного введения.

Должно быть очевидно, что в настоящем описании ссылка на уменьшенное количество и/или серьезность симптомов, когда уменьшение является результатом введения указанной в настоящем описании фармацевтической композиции, предусматривает сравнение с контрольным субъектом, который не получал описанную фармацевтическую композицию. Контрольный субъект может представлять собой, например, (I) этого же субъекта в течение более раннего периода времени (например, в предыдущий сезон вируса гриппа А), (II) субъекта того же или аналогичного: возраста или возрастной группы; пола; статуса беременности; хронического заболевания (например, хронического сердечного, легочного, почечного, метаболического, неврологического, печеночного или гематологического заболевания) или с их отсутствием; и/или иммуносупрессивного состояния или его отсутствия; или (III) субъекта, типичного для популяции (например, местной, региональной или национальной, в том числе того же или аналогичного возраста или возрастного диапазона и/или

общего состояния здоровья) во время сезона вируса гриппа А. Наличие профилактического действия можно определять, например, по отсутствию развития диагностированной инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, и/или отсутствию симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызываемой вирусом гриппа А, в течение части полного сезона гриппа А или в течение всего сезона гриппа А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, представленные в настоящем описании, включают введение в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, субъекту, имеющему непосредственный риск заражения вирусом гриппа А. Непосредственный риск заражения вирусом гриппа А, как правило, имеет место во время эпидемии гриппа А. Известно, что вирусы гриппа А могут циркулировать и вызывать сезонные эпидемии болезни (WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 6 ноября, 2018 г.). В умеренном климате сезонные эпидемии главным образом происходят зимой, в то время как в тропических областях грипп может встречаться в течение всего года, вызывая более нерегулярные вспышки. Например, в северном полушарии риск эпидемии гриппа А является высоким в ноябре, декабре, январе, феврале и марте, а в южном полушарии риск эпидемии гриппа А является высоким в мае, июне, июле, августе и сентябре.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, применяют для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до трех месяцев до (возможного) заражения вирусом гриппа А, вплоть до одного месяца до (возможного) заражения вирусом гриппа А, вплоть до двух недель до (возможного) заражения вирусом гриппа А или вплоть до одной недели до (возможного) заражения вирусом гриппа А. В указанных вариантах осуществления изобретения способ профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, включает введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, при этом фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до шести месяцев до (возможного) заражения вирусом гриппа А (например, в том числе вплоть до

шести месяцев до ожидаемого или возможного контакта с вирусом гриппа А), вплоть до трех месяцев до (возможного) заражения вирусом гриппа А, вплоть до одного месяца до (возможного) заражения вирусом гриппа А, вплоть до двух недель до (возможного) заражения вирусом гриппа А или вплоть до одной

5 недели до (возможного) заражения вирусом гриппа А. В некоторых других вариантах осуществления изобретения способ профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, включает введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, при этом фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до шести дней,

10 вплоть до пяти дней, вплоть до четырех дней, вплоть до трех дней или вплоть до двух дней до появления первых симптомов заражения вирусом гриппа А. Указанный режим обработки относится прежде всего к применению фармацевтической композиции для профилактики заражения вирусом гриппа А.

В некоторых вариантах способов, указанных в описании, в которых

15 фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, применяют для профилактики, способ, представленный в настоящем описании, включает введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, за 1-2 месяца до начала сезона гриппа или в первые 1-2 месяца сезона гриппа.

20 В некоторых вариантах способов, указанных в описании, после первого введения фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, можно осуществлять одно или несколько последующих введений. Указанные варианты осуществления изобретения включают, например, способ, который включает введение субъекту в терапевтически эффективном количестве

25 фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, с интервалом, выбранным из следующих интервалов: один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев. Другие указанные варианты осуществления изобретения включают, например, способ, который включает

30 введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, с интервалом, выбранным из следующих интервалов: один раз в год и два раза в год. Другие указанные варианты осуществления изобретения включают, например, способ, который

включает введение субъекту в терапевтически эффективном количестве фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, с интервалом, выбранным из следующих интервалов: один раз в год и два раза в год или два раза в год в течение общего периода обработок, выбранного из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти и десяти лет.

В каждом из указанных в описании вариантов способов введение в терапевтически эффективном количестве (либо для целей профилактики, либо лечения, либо обеих целей) включает введение фармацевтической композиции в количестве, которое обеспечивает доставку в терапевтически эффективной дозе нейтрализующего антитела против вируса гриппа А. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве включает доставку дозы антитела, составляющей от примерно 50 мг до примерно 3000 мг. В зависимости от концентрации антитела в фармацевтической композиции для достижения требуемой дозы антитела может требоваться несколько инъекций или инфузий в качестве части одного введения. Например, если субъект должен получать дозу антитела, составляющую 600 мг, и фармацевтическая композиция поставляется в готовых шприц-флаконах, содержащих 2 мл водного раствора, содержащего нейтрализующее антитело к вирусу гриппа А в концентрации 150 мг/мл, то для введения дозы 600 мг должно потребоваться две инъекции (каждый шприц-флакон содержит 300 мг антитела). Даже, если несколько инъекций или инфузий требуется для введения указанной дозы, то дозу обозначают как «однократная доза», и введение рассматривают как «однократное введение». В целом, если для введения указанной однократной дозы требуется несколько инъекций или инфузий, то несколько инъекций или инфузий осуществляют в течение периода времени, составляющего примерно 5 мин или менее, примерно 15 мин или менее, примерно 30 мин или менее, примерно 1 ч или менее, примерно 2 ч или менее, примерно 4 ч или менее, примерно 6 ч или менее, примерно 1 день или менее, примерно 1 неделю или менее или примерно 1 месяц или менее.

В некоторых вариантах способов, указанных в описании, доставка в терапевтически эффективной дозе антитела, представленного в настоящем описании, включает доставку субъекту однократной дозы нейтрализующего антитела против вируса гриппа А, составляющей от примерно 60 мг до примерно

2500 мг. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, указанные в описании, включают введение субъекту фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки однократной дозы нейтрализующего антитела против вируса гриппа А, выбранной из дозы, составляющей вплоть до 5 60 мг, дозы, составляющей вплоть до 300 мг, дозы, составляющей вплоть до 1200 мг, дозы, составляющей вплоть до 1800 мг, дозы, составляющей вплоть до 2000 мг, и дозы, составляющей вплоть до 2500 мг. В других вариантах осуществления изобретения способы, указанные в описании, включают доставку субъекту фармацевтической композиции в количестве, достаточном для 10 достижения однократной дозы нейтрализующего антитела против вируса гриппа А, выбранной из 60 мг, 300 мг, 1200 мг и 1800 мг. В следующих вариантах осуществления изобретения способы, указанные в описании, включают доставку субъекту фармацевтической композиции в количестве, достаточном для достижения однократной дозы нейтрализующего антитела против вируса гриппа 15 А, выбранной из 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1100 мг и 1200 мг.

В конкретных вариантах способов, указанных в описании, введение фармацевтической композиции обеспечивает системную экспозицию нейтрализующего антитела против вируса гриппа А, представленного в 20 настоящем описании, в организме субъекта в течение периода времени, выбранного по меньшей мере из 10 недель, по меньшей мере из 15 недель и по меньшей мере из 20 недель после однократного введения. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения нейтрализующее антитело против вируса гриппа А может характеризоваться периодом $t_{1/2}$ в организме человека, превышающим 40 дней. Например, при осуществлении способов, при 25 применении фармацевтических композиций и нейтрализующих антител против вируса гриппа А, указанных в описании, может достигаться период $t_{1/2}$ нейтрализующих антител против вируса гриппа А, выбранный из более чем 45 дней, более чем 50 дней, более чем 55 дней, более чем 60 дней и более чем 65 30 дней. В других вариантах осуществления изобретения при осуществлении способов, при применении фармацевтических композиций и нейтрализующих антител против вируса гриппа А, указанных в описании, может достигаться период $t_{1/2}$ нейтрализующих антител против вируса гриппа А, выбранный из 40-

70 дней, 45-65 дней и 50-60 дней. В следующих вариантах осуществления изобретения при осуществлении способов при применении фармацевтических композиций и нейтрализующих антител против вируса гриппа А, указанных в описании, может достигаться период $t_{1/2}$ нейтрализующих антител против вируса гриппа А, выбранный из одного из следующих периодов: 50 дней, 51 день, 52 дня, 53 дня, 54 дня, 55 дней, 56 дней, 57 дней, 58 дней, 59 дней, 60 дней, 61 день, 62 дня, 63 дня, 64 дня, 65 дней, 66 дней, 67 дней, и 68 дней.

Способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, могут включать введение фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки субъекту однократной дозы, составляющей 60 мг, нейтрализующего антитела против вируса гриппа А. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения доставка нейтрализующего антитела против вируса гриппа А в однократной дозе, составляющей 60 мг, обеспечивает системную экспозицию антитела в организме субъекта в течение длительного периода времени, при этом концентрация антитела в сыворотке субъекта составляет от примерно 1 мкг/мл до примерно 4,5 мкг/мл в течение вплоть до 140 дней после введения.

Способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, могут включать введение фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки субъекту однократной дозы, составляющей 300 мг, нейтрализующего антитела против вируса гриппа А. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения доставка нейтрализующего антитела против вируса гриппа А в однократной дозе, составляющей 300 мг, обеспечивает системную экспозицию антитела в организме субъекта в течение длительного периода времени, при этом концентрация антитела в сыворотке субъекта составляет от примерно 5 мкг/мл до примерно 26,5 мкг/мл в течение вплоть до 140 дней после введения.

Способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, могут включать введение фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки субъекту однократной дозы, составляющей 1200 мг, нейтрализующего антитела против вируса гриппа А. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения доставка нейтрализующего антитела против вируса гриппа А в однократной дозе,

составляющей 1200 мг, обеспечивает системную экспозицию антитела в организме субъекта в течение длительного периода времени, при которой концентрация антитела в сыворотке субъекта составляет от примерно 27 мкг/мл до примерно 110 мкг/мл в течение вплоть до 140 дней после введения.

- 5 Способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, могут включать введение фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки субъекту однократной дозы, составляющей 1800 мг, нейтрализующего антитела против вируса гриппа А. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения доставка
- 10 нейтрализующего антитела против вируса гриппа А в однократной дозе, составляющей 1800 мг, обеспечивает системную экспозицию антитела в организме субъекта в течение длительного периода времени, при этом концентрация антитела в сыворотке субъекта составляет от примерно 33,5 мкг/мл до примерно 150 мкг/мл в течение вплоть до 140 дней после введения.
- 15 В любом из указанных в описании способов профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, фармацевтическую композицию можно вводить путем инъекции или инфузии. При введении путем инфузии фармацевтические композиции можно вводить, например, с помощью внутривенной, внутриартериальной или внутрижелудочковой инфузии. При
- 20 введении путем инъекции фармацевтические композиции можно вводить, например, с помощью внутривенной, внутриартериальной, внутрижелудочковой, интрамедуллярной, внутрибрюшинной, подоболочечной или подкожной инъекции. В конкретных вариантах способов, указанных в описании, фармацевтическую композицию вводят с помощью внутримышечной («IM»)
- 25 инъекции.

- В конкретных вариантах указанных в описании способов профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, фармацевтическая композиция и нейтрализующее антитело против вируса гриппа А хорошо переносятся субъектом при введении в количествах и дозах, указанных в
- 30 описании. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, не вызывают у субъекта проявления нежелательного явления (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений

(СТСАЕ). В других вариантах осуществления изобретения способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, не вызывают у субъекта проявления умеренного нежелательного явления (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести

5 нежелательных явлений (СТСАЕ). В следующих вариантах осуществления изобретения способы профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, указанные в описании, не вызывают у субъекта проявления серьезного нежелательного явления (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений (СТСАЕ).

10 В конкретных вариантах способов профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, субъект имеет возраст от 18 до 65 лет. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения субъект имеет индекс массы тела, выбранный из диапазона от 18 кг/м^2 до 32 кг/м^2 и из диапазона от 18 кг/м^2 до 35 кг/м^2 .

15 Комбинированная терапия

Введение фармацевтической композиции, представленной в настоящей описании, согласно способам и вариантам применения, представленным в описании, можно осуществлять индивидуально или в комбинации с коагентом (который обозначают также в контексте настоящего описания как

20 «дополнительный активный компонент»), который может быть полезным для предупреждения и/или лечения гриппозной инфекции.

Под объем изобретения подпадает также введение фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, когда ее вводят субъекту до, одновременно или после введения коагента или осуществления другого

25 терапевтического режима, полезного для лечения и/или предупреждения гриппа. Указанную фармацевтическую композицию, которую применяют в комбинации с указанным коагентом, можно вводить в одной и той композиции или в различных композициях и с использованием одного и того же пути введения или различных путей введения. В контексте настоящего описания понятия типа

30 «комбинированная терапия», «совместное введение», «введение в сочетании друг с другом» и т.п. служат для обозначения совместного действия лекарственных средств (которые следует вводить «в комбинации»). Для этой цели объединенные лекарственные средства, как правило, присутствуют в месте

действия одновременно и/или в перекрывающемся временном окне. Возможен также вариант, при котором действия, запускаемые одним из лекарственных средств, все еще продолжаются (даже, если само лекарственное средство может уже не присутствовать в поддающихся обнаружению количествах) в момент введения другого лекарственного средства, в результате чего эффекты от обоих лекарственных средств могут влиять друг на друга. Однако, если лекарственное средство, вводили задолго до другого лекарственного средства (например, более чем за один, два, три или большее количество месяцев или за год), в результате чего оно уже не присутствовало в поддающихся обнаружению уровнях (или его действия не продолжалось), то введение другого лекарственного средства, как правило, не рассматривается как введение «в комбинации». Например, противогриппозная лекарственная терапия, применяемая в другие (например, последующие) сезоны гриппа, как правило, не относится к применяемой «в комбинации».

Указанные другие терапевтические режимы или коагенты могут, например, быть антивирусными. Антивирусный препарат (или «антивирусный агент» или «антивирусное лекарственное средство») относится к классу лекарственной терапии, применяемой конкретно для лечения вирусных инфекций. Аналогично антибиотикам для бактерий, антивирусные препараты могут обладать широким спектром антивирусного действия в отношении различных вирусов или могут представлять собой специфические антивирусные препараты, которые применяют в отношении конкретных вирусов. В отличие от большинства антибиотиков антивирусные лекарственные средства, как правило, не разрушают их патоген-мишень; вместо этого они обычно ингибируют его развитие.

Таким образом, согласно другому объекту настоящего изобретения фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, вводят в комбинации (до, одновременно или после) антивирусного препарата для (медицинских) применений, указанных в настоящем описании.

Как правило, антивирусный препарат может представлять собой антивирусный препарат широкого спектра действия (который можно применять в отношении вирусов гриппа и других вирусов) или антивирусный препарат, специфический в отношении вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антивирусный препарат не представляет собой

антитело. Например, антивирусный препарат может представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство. Примеры низкомолекулярных лекарственных средств, которые можно применять для профилактики и/или лечения гриппа, описаны у Wu X., Wu X., Sun Q и др. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 7(4), 2017, сс. 826–845. Из сведений, представленных у Wu с соавторами, 2017 г., специалисту в данной области известны различные антивирусные препараты, которые можно применять для профилактики и/или лечения гриппа. Другие антивирусные препараты, которые можно применять при гриппе, описаны у Davidson S. Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. Front Immunol. 9, 2018, с.1946; и у Koszalka P., Tilmanis D., Hurt A.C. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. Influenza Other Respir Viruses. 11(3), 2017, сс. 240–246.

Антивирусные препараты, которые можно применять для профилактики и/или лечения гриппа, включают (I) агенты, мишенью которых являются функциональные белки самого вируса гриппа, и (II) агенты, мишенью которых являются клетки-хозяева, например, эпителиальные клетки.

Агенты, таргетирующие клетки-хозяева, включают антивирусные препараты широкого спектра действия из класса тиазолидов, слитые с сиалидазой белки, интерфероны типа III, ингибиторы Bcl-2 (В-клеточной лимфомы 2), ингибиторы протеазы, ингибиторы V-АТФаза и антиоксиданты. Примеры антивирусных препаратов широкого спектра действия из класса тиазолидов включают нитазоксанид (NTZ), который быстро деацетируется в крови до активной метаболической формы, такой как тизоксанид (TIZ), и второе поколение тиазолидных производных, структуры которых родственны NTZ, таких как RM5061. Флудаз (DAS181) является примером слитых с сиалидазой белков. IFN типа III включают, например, IFN λ . Примеры ингибиторов Bcl-2 включают (но, не ограничиваясь только ими) ABT-737, ABT-263, ABT-199, WEHI-539 и A-1331852 (Davidson S. Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. Front Immunol. 9, 2018, с. 1946). Примеры ингибиторов протеаз включают нафамостат, леупептин, эписилон-аминокапроновую кислоту, камостат и апротинин. Ингибиторы V-АТФазы включают Norakin®, Parkoran®, Antiparkin® и Akineton®. Примером антиоксиданта является альфа-токоферол.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антивирусный препарат представляет собой агент, таргетирующий функциональный белок самого вируса гриппа. Например, антивирусный препарат может таргетировать функциональный белок вируса гриппа, который не представляет собой

5 гемагглютинин. В целом, антивирусные препараты, таргетирующие функциональный белок вируса гриппа, включают ингибиторы проникновения, ингибиторы гемагглютинина, ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы полимеразы вируса гриппа (ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp)), ингибиторы нуклеокапсидного белка, ингибиторы ионного M2-канала и

10 гидрохлорид арбидола. Примеры ингибиторов проникновения включают (но, не ограничиваясь только ими) производные тритерпеноидов, такие как глицирризиновая кислота (глицирризин) и глицерретиновая кислота; сапонины; уралсапонины M-Y (такие как уралсапонины M); декстрансульфат (DS); силимарин; куркумин и лизосоматропные агенты, такие как конканамицин A,

15 бафиломицин A1 и хлороквин. Примеры ингибиторов гемагглютинина включают (но, не ограничиваясь только ими) BMU-27709; стахифлин; встречающиеся в естественных условиях продукты, такие как госсипол, рутин, кверцетин, ксилопин и теафлавины; трехвалентные миметики гликопептидов, такие как соединение 1, описанное у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular

20 inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 7(4), 2017, сс. 826–845; производные подокаприновой кислоты, такие как соединение 2, описанное у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; природный продукт пентациклических тритерпеноидов, такой как соединение 3,

25 описанное у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; и пренилированные индолдикетопиперазиновые алкалоиды, такие как неохинулин В. Примеры ингибиторов нуклеокапсидного белка включают (но, не ограничиваясь только ими) нуклеозин, циклогексимид, напроксен и ингавирин.

30 Примеры ингибиторов ионного M2-канала включают (но, не ограничиваясь только ими) разрешенные для применения ингибиторы M2 амантадин и римантадин и их производные; а также соединения, не относящиеся к

производным адамантанов, такие как производные спермина, спермидина, спиропиперидина и пинанамина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения противовирусный препарат выбирают из ингибиторов нейраминидазы (NA) и ингибиторов полимеразы вируса гриппа (ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp)). Примеры ингибиторов нейраминидазы (NA) включают (но, не ограничиваясь только ими) занамивир; осельтамивир; перамивир; ланинамивир; их производные, такие как соединения 4 – 10, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; и димерные конъюгаты занамивира (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; производные бензойной кислоты (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845, например соединения 11 – 14); пирролидиновые производные (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845, такие как соединения 15-18); конъюгаты гинкгетин-сиаловая кислота; флаваноиды и флавоноиды изоскуттеллареин и его производные (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845); AV5080; и N-замещенные аналоги осельтамивира (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845). Примеры ингибиторов полимеразы вируса гриппа включают (но, не ограничиваясь только ими)(ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp)) RdRp-разрушающие соединения, такие как описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др., Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; PB2-специфические ингибиторы связывания кэпа, такие как JNJ63623872 (VX-787); кэп-зависимые ингибиторы эндонуклеазы, такие как балоксавир марбоксил (S-033188); ингибиторы PA-эндонуклеазы, такие как AL-794, EGCG (галат

эпигаллокатехина) и его альфатические аналоги, N-гидроксамовые кислоты и N-гидроксиимиды, флутимид и его ароматические аналоги, производные тетрамовой кислоты, L-742,001, ANA-0, полифенольные катехины, аналоги фенетилфенилфталимидов, макроциклические бисбибензилов, пирииминолы, фуллерены, гидроксифинолиноны, гидроксипиридиноны, гидроксипиридазиноны, несущие тригидроксифенил соединения, 2-гидроксифенилаиды, гидроксипирииминоны, β -дикетокислоты и их биоизостерические производные, тиосемикарбазоны, бисдигидроксифинолкарбоамида и пиридопиперазиндионоы (Endo-1); и ингибиторы нуклеозидов и аналогов азотистых оснований, такие как рибавирин, фавипиравир (T-705), 2'-дезоксифторгуанозин (2'-FdG), 2'-замещенные аналоги карбануклеозидов, 6-метил-7-замещенные-7-дезапуриновые нуклеозидные аналоги и 2'-дезоксифторцитидин (2'-FdC). Например, антивирусный препарат может представлять собой занавир, осельтамивир или балоксавир.

Таким образом, фармацевтическая композиция, представленная в настоящем описании, может содержать один или несколько дополнительных активных компонентов. Нейтрализующее антитело против вируса гриппа А, представленное в настоящем описании, может присутствовать в той же фармацевтической композиции, что и дополнительный активный компонент (коагент). Альтернативно этому, нейтрализующее антитело против вируса гриппа А, представленное в настоящем описании, и дополнительный активный компонент (коагент) входят в различные фармацевтические композиции (например, не в одну и ту же композицию). Таким образом, если предполагается применение нескольких дополнительных активных компонентов (коагентов), то каждый дополнительный активный компонент (коагент) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленное/представленный в настоящем описании, могут содержаться в различных фармацевтических композициях. Указанные различные фармацевтические композиции можно вводить либо совместно/одновременно, либо в различные моменты времени, и/или с помощью различных путей введения.

Нейтрализующее антитело против вируса гриппа А, представленное в настоящем описании, и дополнительный активный компонент (коагент) могут

оказывать дополнительное или синергетическое терапевтическое действие.

Понятие «синергизм» применяют для обозначения объединенного действия двух или большего количества действующих веществ, которое превышает сумму индивидуальных действий каждого из соответствующих действующих веществ.

- 5 Так, когда объединенное действие двух или большего количества действующих веществ приводит к «синергетическому ингибированию» активности или процесса, это означает, что ингибирование активности или процесса превышает сумму ингибирующих действий каждого из соответствующих действующих веществ. Понятие «синергетическое терапевтическое действие» относится к
- 10 терапевтическому действию, наблюдаемому при объединении двух или большего количества терапий, если терапевтическое действие (оцениваемое любым из нескольких параметров) превышает сумму индивидуальных терапевтических действий, наблюдаемых при применении соответствующих индивидуальных терапий.

- 15 Таким образом, в настоящем описании предложена также комбинация (I) нейтрализующего антитела против вируса гриппа А, указанного в описании, и (II) противовирусного агента, описанного выше.

Настоящее описание включает следующие примеры вариантов осуществления изобретения.

- 20 Вариант осуществления изобретения 1. Антитело, которое содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; и мутации M428L и N434S в константной
- 25 области тяжелой цепи.

Вариант осуществления изобретения 2. Антитело по варианту осуществления изобретения 1, в котором антитело связывается с гемагглютинином вируса гриппа А.

- 30 Вариант осуществления изобретения 3. Антитело по варианту осуществления изобретения 1 или 2, в котором антитело нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А.

Вариант осуществления изобретения 4. Антитело по варианту осуществления изобретения 3, в котором антитело нейтрализует инфекцию,

вызываемую вирусом гриппа А, в дозе, которая не превышает половину дозы, требуемой для нейтрализации гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации М428L и N434S в константной области тяжелой цепи.

5 Вариант осуществления изобретения 5. Антитело по варианту осуществления изобретения 4, в котором доза не превышает одной третьей части дозы, требуемой для нейтрализации гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела.

10 Вариант осуществления изобретения 6. Антитело по варианту осуществления изобретения 4 или 5, в котором доза не превышает одной пятой части дозы, требуемой для нейтрализации гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела.

15 Вариант осуществления изобретения 7. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело представляет собой человеческое антитело.

 Вариант осуществления изобретения 8. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

20 Вариант осуществления изобретения 9. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело относится к IgG-типу.

 Вариант осуществления изобретения 10. Антитело по варианту осуществления изобретения 6, в котором антитело относится к IgG1-типу.

25 Вариант осуществления изобретения 11. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором легкая цепь антитела представляет собой легкую каппа-цепь.

 Вариант осуществления изобретения 12. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 70% SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 70% SEQ ID NO: 8,

30

в которых сохраняются CDR- последовательности, указанные в варианте осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 13. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело
5 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются CDR-последовательности, указанные в варианте
10 осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 14. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело
содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 7,
15 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются CDR-последовательности, указанные в варианте осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 15. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело
20 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются CDR-последовательности, указанные в варианте
25 осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 16. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело
содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную
30 последовательность, которая идентична по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 8,

в которых сохраняются CDR-последовательности, указанные в варианте осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 17. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело
5 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются CDR-последовательности, указанные в варианте
10 осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 18. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменную область
15 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются CDR-последовательности, указанные в варианте осуществления изобретения 1.

Вариант осуществления изобретения 19. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором CH3-участок
20 антитела не содержит никаких дополнительных мутаций помимо M428L и N434S.

Вариант осуществления изобретения 20. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором Fc-область антитела не содержит никаких дополнительных мутаций помимо M428L и
25 N434S.

Вариант осуществления изобретения 21. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую
30 аминокислотную последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления изобретения 22. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором антитело имеет переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной

последовательности, которая представлена в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления изобретения 23. Антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, предназначенное для применения для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом необязательно антитело или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, ингибирует *in vitro* инфекцию, вызываемую вирусом гриппа, что характеризуется величиной IC₅₀ примерно 2,17 мкг/мл.

Вариант осуществления изобретения 24. Антитело, предназначенное для применения согласно варианту осуществления изобретения 23, где антитело вводят в профилактическом режиме.

Вариант осуществления изобретения 25. Антитело, предназначенное для применения согласно варианту осуществления изобретения 23 или 24, где субъект, подлежащий лечению, имеет непосредственный риск заражения гриппом А.

Вариант осуществления изобретения 26. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, который кодирует антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1–22.

Вариант осуществления изобретения 27. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления изобретения 26.

Вариант осуществления изобретения 28. Клетка, экспрессирующая антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1–22 или содержащая вектор по варианту осуществления изобретения 27.

Вариант осуществления изобретения 29. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1–22, нуклеиновую кислоту по варианту осуществления изобретения 26, вектор по варианту осуществления изобретения 27 или клетку по варианту осуществления изобретения 28 и необязательно фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

Вариант осуществления изобретения 30. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления изобретения 29, содержащая антитело в концентрации 150 мг/мл.

Вариант осуществления изобретения 31. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления изобретения 30 или 31, дополнительно содержащая воду (например, воду для инъекций USP-класса или стерильную воду для инъекций US-класса).

5 Вариант осуществления изобретения 32. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 38-40, дополнительно содержащая гистидин необязательно в концентрации от 10мМ до 40мМ, предпочтительно 20мМ, в составе фармацевтической композиции.

10 Вариант осуществления изобретения 33. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 29-32, дополнительно содержащая сахар, такой как дисахарид, такой как сахароза, необязательно в диапазоне концентраций от 3,0% до 9,0% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 3,6% до 8,6%, более предпочтительно в диапазоне от 4% до 6%.

15 Вариант осуществления изобретения 34. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 29-33, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество или трехблочный сополимер, необязательно полисорбат или полуксамер 188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), необязательно в диапазоне концентраций от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

20 Вариант осуществления изобретения 35. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 29-34, где фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 или в диапазоне от 5,8 до 6,2, или рН 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5, предпочтительно 6,0.

25 Вариант осуществления изобретения 36. Применение антитела по одному из вариантов осуществления изобретения 1–22, нуклеиновой кислоты по варианту осуществления изобретения 26, вектора по варианту осуществления изобретения 27, клетки по варианту осуществления изобретения 28 или фармацевтической композиции по одному из вариантов осуществления изобретения 29-35 для приготовления лекарственного средства для
30 профилактики, лечения или ослабления инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

Вариант осуществления изобретения 37. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1–2, нуклеиновая кислота по варианту

осуществления изобретения 26, вектор по варианту осуществления изобретения 27, клетка по варианту осуществления изобретения 28 или фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 29-35, предназначенные для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

Вариант осуществления изобретения 38. Антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения согласно варианту осуществления изобретения 37, где антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят в профилактическом режиме.

Вариант осуществления изобретения 39. Антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения согласно варианту осуществления изобретения 37 или варианту осуществления изобретения 38, где антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или композицию вводят в комбинации с противовирусным препаратом.

Вариант осуществления изобретения 40. Антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения согласно варианту осуществления изобретения 39, где противовирусный препарат выбирают из ингибиторов нейраминидазы и ингибиторов полимеразы вируса гриппа.

Вариант осуществления изобретения 41. Антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения согласно варианту осуществления изобретения 39 или 40, где противовирусный препарат выбирают из осельтамивира, занамивира и балоксавира.

Вариант осуществления изобретения 42. Комбинация
(I) антитела по одному из вариантов осуществления изобретения 1-22 и
(II) противовирусного препарата.

Вариант осуществления изобретения 43. Комбинация по варианту осуществления изобретения 42, в которой противовирусный препарат выбран из ингибиторов нейраминидазы и ингибиторов полимеразы вируса гриппа.

Вариант осуществления изобретения 44. Комбинация по варианту осуществления изобретения 42 или 43, в которой противовирусный препарат выбран из осельтамивира, занамивира и балоксавира.

Вариант осуществления изобретения 45. Комбинация по одному из вариантов осуществления изобретения 42-44, предназначенная для применения для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

5 Вариант осуществления изобретения 46. Способ снижения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, или снижения риска заражения вирусом гриппа А, включающий: введение субъекту, который нуждается в этом, в терапевтически эффективном количестве антитела по одному из вариантов осуществления изобретения 1-22.

10 Вариант осуществления изобретения 47. Способ по варианту осуществления изобретения 46, в котором антитело вводят в профилактическом режиме.

Вариант осуществления изобретения 48. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 46 или 47, в котором указанный субъект имеет непосредственный риск заражения гриппом А.

15 Вариант осуществления изобретения 49. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 46-48, в котором антитело вводят в комбинации с антивирусным препаратом.

20 Вариант осуществления изобретения 50. Способ лечения или предупреждения заражения вирусом гриппа А субъекта, где способ включает введение субъекту однократной дозы фармацевтической композиции, содержащей антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-22, где необязательно антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9.

25 Вариант осуществления изобретения 51. Способ по варианту осуществления изобретения 50, в котором фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации от 100 мг/мл до 200 мг/мл, например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

30 Вариант осуществления изобретения 52. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50 или 51, в котором однократная доза содержит 3, 4, 5, 6 или 7, предпочтительно 5 мг антитела на кг веса тела субъекта.

Вариант осуществления изобретения 53. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-52, в котором однократная доза содержит вплоть до 60 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 1200 мг, вплоть до 1800 мг или вплоть до 3000 мг антитела.

5 Вариант осуществления изобретения 54. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-53, в котором антитело вводят в дозе 60, 300, 1200 или 1800 мг.

10 Вариант осуществления изобретения 55. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-54, в котором антитело вводят в дозе 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1100 или 1200 мг.

Вариант осуществления изобретения 56. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-55, в котором субъект представляет собой человека.

15 Вариант осуществления изобретения 57. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-56, где способ включает внутримышечную (IM) инъекцию.

20 Вариант осуществления изобретения 58. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-57, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду (например, воду для инъекций USP-класса или стерильную воду для инъекций US-класса).

Вариант осуществления изобретения 59. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-58, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит в составе композиции гистидин, необязательно в концентрации от 10мМ до 40мМ, предпочтительно 20мМ.

25 Вариант осуществления изобретения 60. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-59, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит сахар, такой как дисахарид, такой как сахароза, необязательно в диапазоне концентраций от 3,0% до 9,0% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 3,6% до 8,6%, более предпочтительно в
30 диапазоне от 4% до 6%.

Вариант осуществления изобретения 61. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-60, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество или трехблочный

сополимер, необязательно полисорбат или полуксамер 188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), необязательно в диапазоне концентраций от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

5 Вариант осуществления изобретения 62. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-61, в котором фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от 5,8 до 6,2, в диапазоне от 5,9 до 6,1, или 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

10 Вариант осуществления изобретения 63. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-62, в котором однократная доза содержит или состоит из от 0,8 мл до 4 мл фармацевтической композиции на инъекцию.

15 Вариант осуществления изобретения 64. Способ по варианту осуществления изобретения 63, в котором однократная доза содержит или состоит из 0,8 мл, 0,9 мл, 1,0 мл, 1,1 мл, 1,2 мл, 1,3 мл, 1,4 мл, 1,5 мл, 1,6 мл, 1,7 мл, 1,8 мл, 1,9 мл, 2,0 мл, 2,1 мл, 2,2 мл, 2,3 мл, 2,4 мл, 2,5 мл, 2,6 мл, 2,7 мл, 2,8 мл, 2,9 мл, 3,0 мл, 3,1 мл, 3,2 мл, 3,3 мл, 3,4 мл, 3,5 мл, 3,6 мл, 3,7 мл, 3,8 мл, 3,9 мл или 4,0 мл фармацевтической композиции на инъекцию.

20 Вариант осуществления изобретения 65. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-64, в котором примерно через 4 недели, примерно через 12 недель и/или примерно через 20 недель после введения субъекту фармацевтической композиции субъект: (I) имеет уменьшенное количество и/или серьезность респираторного симптома, выбранного из: кашля, боли в горле, ринореи и заложенности носа или любой их комбинации, и/или (II) имеет уменьшенное количество и/или серьезность системного симптома, выбранного из: лихорадки (температура в ротовой полости $>38^{\circ}\text{C}$ ($100,4^{\circ}\text{F}$); озноба; миалгии; головной боли; недомогания; усталости; или любой их комбинации, по сравнению с референс-субъектом (например, субъектом такого же пола, возраста, веса тела и/или общего состояния здоровья) в течение такого же периода времени, который получал плацебо или не получал лечения или вакцины против гриппа А.

30 Вариант осуществления изобретения 66. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-67, в котором субъект имеет возраст от 18 до 65 лет и/или имеет индекс массы тела в диапазоне от 18 кг/м^2 до 32 кг/м^2 или в диапазоне от 18 кг/м^2 до 35 кг/м^2 .

Вариант осуществления изобретения 67. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-66, в котором: (I) однократная доза содержит 300 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде одной инъекции, содержащей 2 мл фармацевтической композиции; (II) однократная доза содержит 1200 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде двух инъекций, каждая из которых содержит 4 мл композиции; (III) однократная доза содержит 1800 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде трех инъекций, каждая из которых содержит 4 мл фармацевтической композиции; или (IV) однократная доза содержит 60 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде одной инъекции, содержащей 0,4 мл фармацевтической композиции.

Вариант осуществления изобретения 68. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-67, включающий введение субъекту фармацевтической композиции один раз в течение шестимесячного периода.

Вариант осуществления изобретения 69. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-68, включающий введение субъекту однократной дозы, содержащей фармацевтическую композицию, один раз в течение двенадцатимесячного периода.

Вариант осуществления изобретения 70. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-68, включающий введение субъекту фармацевтической композиции дважды в течение шестимесячного периода, например, один раз каждые три месяца.

Вариант осуществления изобретения 71. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-70, включающий введение фармацевтической композиции за 1-2 месяца до начала сезона гриппа (например, в США сезон гриппа начинается в октябре, ноябре или декабре) или в первые 1-2 месяца сезона гриппа.

Вариант осуществления изобретения 72. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-71, в котором антитело или фармацевтическая

композиция, содержащая антитело, ингибирует *in vitro* инфекцию, вызываемую вирусом гриппа, что характеризуется величиной IC_{90} примерно 2,17 мкг/мл.

Вариант осуществления изобретения 73. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-72, включающий введение субъекту однократной дозы фармацевтической композиции, в котором композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде одной инъекции, содержащей 2 мл фармацевтической композиции, и в котором: (I) введенная фармацевтическая композиция содержит примерно 60 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 1 мкг/мл до примерно 7 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения; (II) введенная фармацевтическая композиция содержит примерно 300 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 8 мкг/мл до примерно 20 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения; (III) введенная фармацевтическая композиция содержит примерно 1200 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 50 мкг/мл до примерно 100 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения; (IV) введенная фармацевтическая композиция содержит примерно 1800 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 70 мкг/мл до примерно 110 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения; и/или (V) антитело имеет период $t_{1/2}$ *in vivo* у субъекта, составляющий от 49 до 68 дней.

Вариант осуществления изобретения 74. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-73, в котором антитело в фармацевтической композиции имеет период $t_{1/2}$ *in vivo* в организме человека, составляющий от 49 до 68 дней, например, 49 дней, 50 дней, 51 день, 52 дня, 53 дня, 54 дня, 55 дней, 56 дней, 57 дней, 58 дней, 59 дней, 60 дней, 61 день, 62 дня, 63 дня, 64 дня, 65 дней, 66 дней, 67 дней или 68 дней.

Вариант осуществления изобретения 75. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-74, в котором у субъекта не проявляется нежелательное явление (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений (СТСАЕ), необязательно вплоть до 140 дней после введения однократной дозы фармацевтической композиции.

Вариант осуществления изобретения 76. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-75, в котором у субъекта не проявляется умеренное нежелательное явление (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений (СТСАЕ), необязательно вплоть до 140 дней после введения однократной дозы фармацевтической композиции.

Вариант осуществления изобретения 77. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-76, в котором у субъекта не проявляется серьезное нежелательное явление (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений (СТСАЕ), необязательно вплоть до 140 дней после введения однократной дозы фармацевтической композиции.

Вариант осуществления изобретения 78. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 50-77, в котором: (I) однократная доза содержит 300 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза включает одну инъекцию, содержащую 2 мл фармацевтической композиции; (II) однократная доза содержит 1200 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза включает две инъекции, каждая из которых содержит 4 мл фармацевтической композиции; (III) однократная доза содержит 1800 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза включает три инъекции, каждая из которых содержит 4 мл фармацевтической композиции; или (IV) однократная доза содержит 60 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза содержит 0,4 мл композиции.

Вариант осуществления изобретения 79. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, которое содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9, где антитело присутствует в фармацевтической композиции в концентрации, находящейся в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, такой как 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

Вариант осуществления изобретения 80. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления изобретения 79, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду (например, воду для инъекций USP-класса или стерильную воду для инъекций US-класса).

5 Вариант осуществления изобретения 81. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления изобретения 79 или 80, дополнительно содержащая гистидин необязательно в концентрации от 10мМ до 40мМ, предпочтительно 20мМ, в составе композиции.

10 Вариант осуществления изобретения 82. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 79-81, дополнительно содержащая сахар, такой как дисахарид, такой как сахароза, в диапазоне концентраций от 3,0% до 9,0% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 3,6% до 8,6%, более предпочтительно в диапазоне от 4% до 6%.

15 Вариант осуществления изобретения 83. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 79-82, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество или трехблочный сополимер, необязательно полисорбат или полоксамер 188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), необязательно в диапазоне концентраций от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02%.

20 Вариант осуществления изобретения 84. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения 79-83, где композиция имеет рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 или в диапазоне от 5,8 до 6,2, или рН 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5, предпочтительно 6,0.

25 Вариант осуществления изобретения 85. Флакон, предпочтительно стеклянный, содержащий фармацевтическую композицию по одному из вариантов осуществления изобретения 79-84.

Вариант осуществления изобретения 86. Шприц (предварительно заполненный) содержащий фармацевтическую композицию по одному из вариантов осуществления изобретения 79-84.

30 Краткое описание чертежей

Ниже представлено краткое описание прилагаемых чертежей. Чертежи предназначены для более подробной иллюстрации настоящего изобретения.

Однако они никоим образом не направлены на ограничение сущности изобретения.

На чертежах показано:

- на фиг. 1 – представленные в примере 2 данные о концентрации
5 человеческих антител FluAB_MLNS (не закрашенные кружки) и FluAB_wt (применяемое для сравнения антитело; закрашенные кружки) в образцах плазмы макака, измеренной методом ELISA, в течение периода времени вплоть до дня 56;
- на фиг. 2А-2Б – представленные в примере 3 данные о концентрации в
10 плазме FluAB_MLNS (животные С90142 (А), С90190 (Б)), полученные методом ELISA с использованием антитела к CH2, для количественной оценки уровня общего человеческого МАт или связывания антигена НА с целью определения функциональности МАт. На графике представлены обработанные методом линейной регрессии зависимости между количественной оценкой уровня общего человеческого МАт и уровнем связывания НА для отдельных животных в
15 выбранные моменты времени (дни 1, 21, 56, 86 и 113);
- на фиг. 3А-3Б – представленные в примере 4 (3А) данные о концентрациях человеческих антител FluAB_MLNS и FluAB_wt в мазках из носа, измеренные методом ELISA и стандартизованные относительно содержания мочевины; и
20 (3Б) данные о биораспределении человеческих антител FluAB_MLNS и FluAB_wt в виде выраженного в % соотношения концентраций, стандартизованных относительно содержания мочевины, в мазках из носа и в плазме. Ниже указаны ID индивидуальных животных и вариант применяемого для инокуляции человеческого антитела (FluAB_MLNS или FluAB_wt);
- на фиг. 4А-4Д – представленная в примере 5 зависимость от времени
25 кумулятивного изменения веса тела (BW) мышей линии Tg32, которых обрабатывали либо FluAB_wt (4Б, 4Г, кружки), либо FluAB_MLNS (4В, 4Д, квадраты) в дозе 1 мг/кг (4Б, 4В, серые символы) и 0,3 мг/кг (4Г, 4Д, светло-серые символы), либо оставляли без обработки (4А, треугольники); всех мышей заражали интраназально вирусом PR8. Представлены данные для
30 индивидуальных животных; жирной черной линией обозначена средняя зависимость $BW \pm SD$. Указано количество особей на группу. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ при сравнении только с контролем (А), ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, во всех случаях при сравнении с обработанными антителом MEDI8852 животными

в соответствующие моменты времени, 2-сторонний дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений;

на фиг. 5А и 5Б - представленные в примере 5 результаты сравнения % выживаемости зараженных самцов мышей линии Tg32, которых либо

5 обрабатывали дозой 1 мг/кг (5А) и дозой 0,3 мг/кг (правая панель) FluAB_wt или FluAB_MLNS, либо не подвергали обработке (5Б). ** $p < 0,01$ при сравнении с необработанными мышами (CTR) и обработанными FluAB_MLNS в дозе 0,3 мг/кг; °°° $p < 0,001$ при сравнении с обработкой FluAB_wt, логранговый анализ, метод Мантеля-Кокса;

10 на фиг. 6 – представленные в примере 5 данные об уровнях циркулирующих инъекцированных антител. Представлены индивидуальные циркулирующие уровни (мкг/мл) FluAB_wt (кружки) и FluAB_MLNS (квадраты), измеренные в сыворотке мышей непосредственно до (день 0) заражения и через 6 дней после заражения. Столбиками показаны средние значения $\pm$ SD;

15 на фиг. 7 – схема планшета, описанная в примере 6, которую использовали в анализе нейтрализации *in vitro*;

на фиг. 8А-8Г – представленные в примере 6 данные о нейтрализующей активности FluAB_MLNS и осельтамивира при их индивидуальном применении в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1N1 (8А, 8В) и H3N2 (8Б, 8Г);

20 на фиг. 9А-9Б – представленные в примере 6 данные об объединенной нейтрализующей активности FluAB_MLNS и осельтамивира в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1 (9А) и H3 (9Б). Данные представлены в виде относительных уровней ингибирования вызываемой вирусами H1N1 (9А) и H3N2 (9Б) инфекции на MDCK-клетках, обусловленных FluAB_MLNS при его
25 индивидуальном применении и FluAB_MLNS в комбинации с взятым в гетеромолярных концентрациях осельтамивиром. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD, полученных по трем повторностям, каждую повторность получали с использованием трех независимых культуральных планшетов;

на фиг. 10А-10Б – описанные в примере 6 графики медианного эффекта
30 комбинаций FluAB_MLNS и осельтамивира. Два соединения серийно разводили в указанных постоянных соотношениях и добавляли к MDCK-клеткам, зараженным либо штаммом H1 вируса (10А), либо штаммом H3 вируса (10Б).

Представлены также значения, полученные при использовании выбранных комбинаций в непостоянных соотношениях (NCR);

на фиг. 11А-11Е – представленные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB_MLNS и осельтамивира в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 12А-12Е – описанные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB_MLNS и осельтамивира в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 13А-13В – описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB_MLNS-осельтамивир в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точками обозначены значения IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для комбинаций FluAB_MLNS-осельтамивир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 14А-14В – описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB_MLNS-осельтамивир в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точками обозначены значения IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для комбинаций FluAB_MLNS-осельтамивир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 15А-15Г – представленные в примере 6 данные о нейтрализующей активности FluAB_MLNS и занамивира при их индивидуальном применении в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1N1 (15А, 15В) и H3N2 (15Б, 15Г);

на фиг. 16А-16Б – представленные в примере 6 данные об объединенной нейтрализующей активности FluAB_MLNS и занамивира в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1 (А) и H3 (Б). Данные представлены в виде относительных уровней ингибирования вызываемой вирусами H1N1 (А) и H3N2 (В) инфекции MDCK-клеток, обусловленного FluAB_MLNS при его индивидуальном применении и FluAB_MLNS в комбинации с взятым в гетеромолярных концентрациях занамивиром. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD, полученных по трем повторностям, каждую повторность получали с использованием трех независимых культуральных планшетов;

на фиг. 17А-17Б – описанные в примере 6 графики медианного эффекта комбинации FluAB_MLNS и занамивира. Два соединения серийно разводили в указанных постоянных соотношениях и добавляли к MDCK-клеткам, зараженным либо штаммом вируса H1 (17А), либо штаммом вируса H3 (17Б). Представлены также значения, полученные при использовании выбранных комбинаций в непостоянных соотношениях (NCR);

на фиг. 18А-18Г – представленные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB_MLNS и занамивира в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 19А-19Г – описанные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB_MLNS и занамивира в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции, полученные согласно процедуре, описанной в примере 6. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 20А-20В – описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB_MLNS-занамивир в отношении

вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точками обозначены значения IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для комбинаций FluAB_MLNS-занамибир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

5 на фиг. 21А-21В – описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB_MLNS-занамибир в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точками обозначены значения IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для комбинаций FluAB_MLNS-занамибир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная
10 концентрация;

 на фиг. 22А-22Г – представленные в примере 6 данные о нейтрализующей активности FluAB_MLNS и балоксавира при их индивидуальном применении в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1N1 (22А, 22В) и H3N2 (22Б, 22Г);

 на фиг. 23А-23Б – представленные в примере 6 данные об объединенной
15 нейтрализующей активности FluAB_MLNS и балоксавира в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1 (23А) и H3 (23Б). Данные представлены в виде относительных уровней ингибирования вызываемой вирусами H1N1 (23А) и H3N2 (23Б) инфекции MDCK-клеток, обусловленного FluAB_MLNS при его индивидуальном применении и FluAB_MLNS в комбинации с взятым в
20 гетеромолярных концентрациях балоксавиром. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD, полученных по трем повторностям, каждую повторность получали с использованием трех независимых культуральных планшетов;

 на фиг. 24А-24Б – описанные в примере 6 графики медианного эффекта
25 комбинации FluAB_MLNS и балоксавира. Два соединения серийно разводили в указанных постоянных соотношениях и добавляли к MDCK-клеткам, зараженным либо штаммом вируса H1 (24А), либо штаммом вируса H3 (24Б). Представлены также значения, полученные при использовании выбранных комбинаций в непостоянных соотношениях (NCR);

30 на фиг. 25А-25Е – описанные в примере 6 данные о комбинационных индексах FluAB_MLNS и балоксавира. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации

лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 26А -26Е – описанные в примере 6 изоболограммы комбинаций FluAB_MLNS-балоксавир. Точками обозначены значения IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для комбинаций FluAB_MLNS-балоксавир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 27А и 27Б – описанный в примере 7 протокол оценки пациентов (пациенты, участвующие в «Части А» исследования, описанного в примере 7) при проведении клинического исследования FluAB_MLNS;

на фиг. 28А-28Б - описанный в примере 7 протокол оценки пациентов (пациенты, участвующие в «Части Б» исследования, описанного в примере 7) при проведении клинического исследования FluAB_MLNS;

на фиг. 29А-29Б –описанный в примере 7 протокол оценки пациентов (пациенты, участвующие в «Части В» исследования, описанного в примере 7) при проведении клинического исследования FluAB_MLNS;

на фиг. 30- описанный в примере 7 протокол мониторинга гриппоподобного заболевания при проведении клинического исследования FluAB_MLNS;

на фиг. 31 –указанные в примере 7 моменты времени фармакокинетических оценок при проведении клинического исследования FluAB_MLNS;

на фиг. 32- указанный в примере 7 перечень лабораторных анализов, которые осуществляли при проведении клинического исследования FluAB_MLNS;

на фиг. 33 – характеристики популяции с высоким риском развития связанных с гриппом осложнений;

на фиг. 34 и фиг. 35 –концентрации FluAB_MLNS в сыворотке у людей, которым вводили FluAB_MLNS при проведении клинического исследования, описанного в примере 7. На фиг. 34 – концентрации антитела в сыворотке пациентов, получавших FluAB_MLNS в начальных дозах 300 мг и 1200 мг в течение промежутка времени, составляющего до 20 и 12 недель соответственно. На фиг. 35 – предполагаемые концентрации антитела FluAB_MLNS в сыворотке в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 6 месяцев, после введения субъекту в дозах 300 мг и 1200 мг;

на фиг. 36 - концентрации антитела FluAB_MLNS в сыворотке у людей, которым вводили FluAB_MLNS при проведении клинического исследования, описанного в примере 7. Показаны концентрации антитела в сыворотке в течение 20 недель после введения субъектам FluAB_MLNS в начальных дозах 60 мг, 300 мг, 1200 мг и 1800 мг;

на фиг. 37 – таблица, в которой представлены различные ФК-параметры FluAB_MLNS, установленные при проведении клинического исследования, подробно описанного в примере 7;

на фиг. 38А и 38Б – данные о связывании человеческого FcRn в растворе с иммобилизованным FluAB_MLNS или FluAB_wt, полученные с помощью Octet при pH=6,0 (А) или pH=7,4 (Б). Момент времени, обозначенный как 0 с, обозначает замену исходного буфера на буфер, содержащий человеческий FcRn. Момент времени 420 с (пунктирная вертикальная линия) обозначает замену на «пустой» буфер при соответствующем значении pH. Профили ассоциации и диссоциации измеряли в реальном времени с использованием Octet RED96 (фирма ForteBio);

на фиг. 39А и 39Б - уровни ADA-ответа, измеренные с помощью ELISA, предназначенного для обнаружения мышиного IgG к лекарственному препарату (А; столбики представляют собой средние значения $\pm$ SD для группы обработки); и результаты корреляционного анализа (Б) между уровнями циркулирующего человеческого IgG, измеренными через 14 дней после i.v.-инъекции (ось X), и ADA-сигналом, присутствующим в этот же самый момент времени (ось Y). Для статистически значимых величин указан непараметрический коэффициент корреляции Спирмана;

на фиг. 40 - данные об уровнях ADA-ответа после подкожной (s.c.) инъекции либо FluAB_MLNS, либо FluAB_wt. Данные представлены в виде ADA-сигнала (ОП при 450 нм), обнаруженного через 3 недели после s.c.-инъекции в каждом индивидуальном образце сыворотки (n=5/группу), который предварительно разводили в 3ФР в соотношении 1:25 и затем дополнительно подвергали 5-кратному серийному разведению.

Примеры

Ниже представлены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления и объекты изобретения. Однако объем настоящего

изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления изобретения, представленными в настоящем описании. Описанные ниже препараты и примеры приведены для более ясного понимания настоящего изобретения и осуществления его на практике специалистами в данной области.

5 Однако объем настоящего изобретения не ограничивается приведенными в качестве примера вариантами осуществления изобретения. Фактически на основе приведенного выше описания, прилагаемых чертежей и приведенных ниже примеров специалистам в данной области должны стать очевидными различные модификации помимо тех, которые представлены в настоящем
10 описании. Все такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Безопасность и переносимость антитела, представленного в настоящем описании, для макак циномолгус

Разрабатывали и получали антитело, представленное в настоящем
15 описании, содержащее (I) последовательности CDR, представленные в SEQ ID NO: 1 – 6, и (II) две мутации M428L и N434S в константных областях тяжелых цепей. Более конкретно, антитело содержит (I) последовательность
вариабельной области тяжелой цепи (VH), представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), представленную в
20 SEQ ID NO: 8; и (II) две мутации M428L и N434S в константных областях тяжелых цепей. Еще более конкретно, антитело содержит тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO: 10. Указанное антитело обозначено в настоящем
25 описании как «FluAB_MLNS».

Для сравнения использовали антитело «FluAB_wt», которое отличается от антитела «FluAB_MLNS» только тем, что не содержит две мутации M428L и N434S в константных областях тяжелых цепей. Таким образом, применяемое для
сравнения антитело «FluAB_wt» содержит тяжелую цепь, которая имеет
30 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO: 10.

Вводили путем однократной внутривенной 60-минутной инфузии либо FluAB_MLNS, либо FluAB_wt в дозе 5 мг/кг в объеме 2,5 мл/кг, используя по три самки макак циномолгус (*Macaca fascicularis*) на тестируемую группу. Кровь или мочу для клинического химического и гематологического анализов

5 собирали до введения дозы и в дни 7 и 21 после введения дозы.

После введения либо FluAB_MLNS, либо FluAB_wt в дозе 5 мг/кг путем 60-минутной внутривенной инфузии осуществляли тщательный мониторинг состояния здоровья и веса тела самок макак циномолгус и регулярно получали образцы крови и мочи. Никаких нежелательных явлений – отличных от гематомы через 24 ч и эритродермии через 3 дня после введения дозы в месте инокуляции у некоторых животных – не было обнаружено после внутривенной инокуляции антител. Все животные, как правило, были здоровы, у них обнаружено нормальное потребление корма, и они в целом имели положительный прирост веса тела в течение эксперимента. Клинические химические, гематологические параметры и результаты анализа мочи оказались нормальными через 7 дней или 21 день после дозирования при сравнении с анализами образцов, полученных до введения дозы.

Таким образом, установлено, что однократная внутривенная инфузия либо FluAB_MLNS, либо FluAB_wt макакам циномолгус не индуцировала нежелательных явлений и в целом хорошо переносилась.

Пример 2: Определение концентрации и фармакокинетических характеристик в плазме

Целью представленных экспериментов было определение концентрации, установление времени полужизни и сравнение фармакокинетических параметров антитела FluAB_MLNS, представленного в настоящем описании, с соответствующими характеристиками применяемого для сравнения антитела FluAB_wt в плазме после однократной внутривенной инъекции.

Перед дозированием животных тестировали в отношении отсутствия у них (негативные животные) специфических для гриппа антител с использованием дот-иммуносвязывания. Серопозитивных животных исключали из опыта, поскольку наличие ранее существующего иммунитета может влиять на результаты теста. Кроме того, исключали животных, у которых развился ответ в виде антител к лекарственному препарату (ADA).

Вводили путем однократной 60-минутной внутривенной инфузии либо FluAB_MLNS, либо FluAB_wt в дозе 5 мг/кг в объеме 2,5 мл/кг, используя по три самки макак циномолгус на тестируемую группу. Кровь собирали в пробирки, содержащие до дозирования K_2EDTA , и обрабатывали для получения плазмы для тестирования фармакокинетики примерно через 1, 6, 24, 96, 168, 504, 840 и 1344 часа (ч) после введения дозы.

Концентрацию антител в плазме определяли *in vitro* с помощью ELISA-анализа. В целом, метод состоял в следующем: антиген IAV-НА (антиген белка гемагглютинирина вируса гриппа A H1N1 A/California/07/2009 (с His-меткой); фирма Sino Biologicals) разводили до концентрации 2 мкг/мл в 3ФР и 25 мкл добавляли в лунки, расположенные на $\frac{1}{2}$ площади плоскодонного 96-луночного планшета для ELISA, для сенсibilизации в течение ночи при 4°C. После сенсibilизации планшеты промывали дважды 0,5-кратным 3ФР, дополненным 0,05% Твин 20 (промывочный раствор), используя автоматическое промывочное устройство для ELISA. Затем планшеты блокировали, используя 100 мкл/лунку 3ФР, дополненного 1% БСА (блокирующий раствор), в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ), а затем промывали дважды. Образцы плазмы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4°C и затем разводили (в соотношении 1:10, а затем 1:30) до достижения конечного разведения 1:300 в блокирующем растворе в 96-луночных планшетах для культуры клеток.

Тестируемое минимальное разведение (1:300) плазмы макак, применявшееся для количественной оценки, гарантировало, что «эффект матрицы» был незначительным. Затем образцы подвергали серийному разведению в соотношении 1:2 в трех повторностях для получения в целом 12 разведений.

Аналогичным образом приготавливали стандарты для каждого подлежащего тестированию антитела посредством разведения антител в соотношении 1:300 до получения концентрации 1 мкг/мл в пуле предварительно инокулированной плазмы из всех тестируемых животных, имитируя матрицу тестируемых образцов. Затем стандарты подвергали серийному разведению в соотношении 1:3 в блокирующем растворе в трех повторностях для получения в целом 12 разведений. Добавляли 25 мкл полученных образцов или стандартов к сенсibilизированным гемагглютинином (НА) лункам и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После четырех промывок добавляли для детекции по 25 мкл на

лунку козьего античеловеческого IgG, конъюгированного с HRP (AffiniPure F(ab')₂-фрагмент, Fcγ-фрагмент специфический; фирма Jackson ImmunoResearch), разведенного в блокирующем растворе в соотношении 1:5000 (конечная концентрация 0,16 мкг/мл), и инкубировали при КТ в течение 1 ч.

5 После четырех промывок планшеты проявляли, добавляя 40 мкл на лунку субстрата SureBlue TMB (фирма Bioconcept). После инкубации в течение ~7-20 мин при КТ, когда цветная реакция достигала плато (max ОП ~3,8), добавляли 40 мкл 1% HCl на лунку для прекращения реакции и измеряли абсорбцию при 450 нм с помощью спектрофотометра.

10 Для определения концентрации антител в плазме обезьян циномолгус строили график зависимости величин ОП, полученных на основе результатов ELISA, от концентрации с помощью программного обеспечения Gen5 (фирма BioTek). Применяли нелинейную подгонку кривой, используя модель с переменной крутизной наклона, четыре параметра и уравнение: $Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$.

15 Величины ОП разведений образцов, которые находились в предполагаемом диапазоне анализа стандартной кривой (по данным, полученным в установочном эксперименте с использованием образцов для контроля качества в верхнем, среднем или низком диапазоне кривой), интерполировали для количественной оценки образцов. Затем определяли

20 концентрацию антител в плазме, учитывая конечное разведение образца. Если более одной величины разведения образца находилось в линейном диапазоне стандартной кривой, то использовали среднее значение этих величин.

Фармакокинетические (ФК) данные анализировали с помощью WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (8.1.0.3530 Core Version,

25 программное обеспечение Phoenix, фирма Certara) с использованием следующих установок: модель: данные для плазмы, введение путем постоянной инфузии; количество не отсутствующих данных: 8; интервал устойчивого состояния Tau: 1,00; время введения дозы: 0,00; уровень дозы: 5,00 мг/кг; продолжительность инфузии: 0,04 дня; метод расчета: линейный метод трапеций с линейной

30 интерполяцией; взвешивание для расчетов лямбда_z: однородное взвешивание; метод лямбда_z: поиск наилучшего подбора для лямбда_z, логарифмическая регрессия. Построение графиков и статистические анализы (линейная регрессия или анализ выбросов) осуществляли с помощью программного обеспечения

Prism 7.0 (фирма GraphPad, Ла-Холья, шт. Калифорния, США). Анализ выбросов осуществляли, используя метод ROUT ($Q=1\%$), который позволяет находить любое количество выбросов в любом направлении.

Результаты представлены на фиг. 1. Анализ образцов плазмы обезьян
5 циномолгус, отобранных вплоть до дня 56 после инокуляции, продемонстрировал, что представленное в настоящем описании антитело FluAB_MLNS имело удлиненное время полужизни *in vivo* относительно применяемого для сравнения антитела FluAB_wt (фиг. 1). С помощью некомпартментального анализа с использованием WinNonLin установлено, что
10 $T_{1/2}$ составляло 19,5 дня для антитела FluAB_MLNS, в то время как $T_{1/2}$ составляло 11,6 дня для применяемого для сравнения антитела FluAB_wt. Нижний предел количественной оценки составлял 300 нг/мл.

Таким образом, установлено, что антитело FluAB_MLNS имело удлиненное время полужизни *in vivo* относительно применяемого для сравнения антитела
15 FluAB_wt по меньшей мере вплоть до дня 56 после инокуляции.

Пример 3: Продолжительная стабильность *in vivo*

Для оценки *in vivo* стабильности и функциональной способности в отношении связывания с антигеном антитела FluAB_MLNS в течение времени фармакокинетические измерения (описанные в примере 2) в группе, которой
20 вводили FluAB_MLNS, продлевали до дней 86 и 113 после инокуляции. В дни 1, 21, 56, 86, 113 после инокуляции количественно оценивали функциональную способность FluAB_MLNS с использованием метода ELISA для определения связывания с гемагглютинином (НА), который описан в примере 2.

Кроме того, определяли общее количество человеческих антител в плазме
25 макак с помощью специфического анти-CH2 ELISA, используя иммобилизованное МАт, которое специфически связывается с CH2-областью человеческих Ат, но не с Ат обезьян. Для измерения общего человеческого IgG и, следовательно, количества всех инокулированных человеческих антител в плазме обезьян циномолгус, применяли ELISA с захватом с помощью мышиного
30 антитела к CH2-домену, специфического для человеческого IgG (клон R10Z8E9; фирма Thermo Scientific). Было подтверждено, что это МАт не дает перекрестную реакцию с IgG обезьян. Для сенсibilизации в лунки, расположенные на $\frac{1}{2}$ площади плоскодонного 96-луночного планшета для

ELISA, добавляли мышинный античеловеческий IgG-CH2 в 3ФР в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшеты промывали и добавляли 100 мкл/лунку блокирующего раствора с 5% БСА в течение 1 ч при КТ. Стандарты FluAB_MLNS приготавливали путем разведения FluAB_MLNS до концентрации 1 нг/мл в блокирующем растворе. Затем стандарты серийно разводили с дублированием в соотношении 1:1,5 в блокирующем растворе с получением в целом 12 разведений. Образцы плазмы обезьян циномолгус центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4°C и серийно разводили до конечного разведения 1:1000, 1:5000 или 1:15000 в блокирующем растворе.

После промывки планшета 25 мкл образцов или стандартов добавляли в планшет для ELISA и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После трех промывок добавляли для детекции по 25 мкл козьего античеловеческого IgG, конъюгированного с HRP (AffiniPure F(ab')₂-фрагмент, Fcγ-фрагмент специфический; фирма Jackson ImmunoResearch), разведенного в блокирующем растворе с 1% БСА, и инкубировали при КТ в течение 45 мин. После трех промывок планшеты проявляли, добавляя 40 мкл на лунку субстрата SureBlue TMB (фирма Biosconcept). После инкубации в течение 20 мин при КТ добавляли 40 мкл 1% HCl для прекращения реакции и измеряли абсорбцию при 450 нм.

Результаты представлены на фиг. 2А-2Б. Оба метода количественной оценки приводили к получению сходных результатов, касающихся концентрации антител в плазме обезьян циномолгус (фиг. 2А-2Б). Дополнительный анализ на основе линейной регрессии продемонстрировал, что зависимость между количественной оценкой на основе НА-связывания и оценкой общего количества антител к CH2 соответствует линейной схеме для всех выбранных моментов времени. Таким образом, общее количество FluAB_MLNS, присутствующее в плазме, обладало функциональностью в отношении связывания со стволовой областью гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А (IAV) также и через 86 и 113 дней после анализа *in vivo*.

Таким образом, при осуществлении удлиненного эксперимента FluAB_MLNS продемонстрировано наличие функционального связывания с антигеном и в результате хорошей продолжительной стабильности *in vivo* вплоть до 113 дней после инокуляции.

Пример 4: Концентрация антител в мазках из носа и биораспределение

Для изучения биораспределения FluAB_MLNS и применяемого для сравнения антитела FluAB_wt между слизистой носа и плазмой определяли концентрацию антитела в мазках из носа. Для этой цели мазки из носа макак, которых использовали в опытах, описанных в примере 2, собирали через 24, 504 и 1344 ч после введения FluAB_MLNS или применяемого для сравнения антитела FluAB_wt. Концентрации антител FluAB_MLNS и FluAB_wt в мазках из носа определяли в целом согласно методу, описанному в примере 2 для определения концентраций в плазме, со следующими небольшими адаптациями: (а) планшеты для ELISA блокировали в течение 2 ч при КТ; (б) образцы мазков из носа разводили, начиная с соотношения 1:2, используя 1% БСА в ЗФР, а затем подвергали серийному разведению в соотношении 1:2 для получения в целом 8 разведений; (в) в качестве контроля «эффекта матрицы» применяли среду для мазка из носа (RT MINI Viral Transport Medium; фирма Coran).

Для устранения различий при осуществлении процедуры получения мазков или в количестве выделений из носа у каждого животного и в различные моменты времени (дни 1, 21 и 56) результаты, полученные с использованием мазков из носа, стандартизовали относительно содержания мочевины. Мочевина свободно диффундирует в крови, присутствуя в сходных количествах в указанных образцах плазмы или мазков (Lim и др., Antimicrob Agents Chemother 61(8), 2017, e00279-17). Для этой цели осуществляли количественное измерение азота мочевины (BUN, азот мочевины крови), используя набор для колориметрического измерения азота мочевины («Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit») (фирма Invitrogen), согласно процедуре производителя. В целом, метод состоял в следующем: образцы разводили в соотношении 1:3 в ЗФР и смешивали с реагентами А и В из набора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Окрашенный продукт окислительно-восстановительной реакции выявляли при 450 нм, используя ридер для 96-луночных микропланшетов. Количественную оценку осуществляли посредством сравнения образцов со стандартами BUN, которые находились в наборе и которые обрабатывали аналогичным образом.

Результаты представлены на фиг. 3А-3Б. Стандартизованное количество антител в мазках из носа снижалось с течением времени (фиг. 3А). Оценка

биораспределения путем сравнения концентраций в носу относительно плазмы продемонстрировала отсутствие различий между FluAB_MLNS и применяемым для сравнения антителом FluAB_wt (фиг. 3Б), это позволяет предположить, что мутация MLNS-Fc хотя и пролонгировала время полужизни FluAB_MLNS в плазме, но не приводила к повышению биораспределения антитела, находящегося в слизистой носа.

Таким образом, при изучении образцов мазков из носа не выявлено никаких существенных различий в биораспределении между слизистой носа и плазмой для вариантов МАт.

Пример 5: Профилактическая активность антитела FluAB_MLNS, оцененная на инфицированных PR8 Tg32-мышях

Далее изучали профилактическую активность FluAB_MLNS в сравнении с антителом FluAB_wt с использованием мышинной модели летальной инфекции, вызываемой штаммом H1N1 гриппа А.

Для изучения профилактической эффективности 9-14-недельным FcRn-/- hFcRn мышам линии 32Tg (фон C57B6) инъекцировали внутривенно (i.v.) (через хвостовую вену) 5 мл/кг раствора, содержащего антитело FluAB_MLNS или применяемое для сравнения антитело FluAB_wt, используя диапазон доз от 0,3 до 1 мг/кг. Через 24 ч после i.v.-инъекции у мышей собирали образцы крови из хвостовой вены для определения уровней антител в сыворотке до инъекции. Сбор образцов крови повторяли также в дни 6 и 13 после инъекции (p.i.). Мышей, которым инъекцировали антитело, и необработанных мышей анестезировали (изофлуран, 4% в O₂, 0,3 л/мин) и осуществляли контрольное заражение интраназально (i.n.) путем медленного закапывания в обе ноздри 50 мкл (25 мкл/в каждую) ЗФР, содержащего 5 летальных для 50% мышей доз (5 MLD₅₀, что эквивалентно 1200 TCID₅₀/мышь) вируса гриппа А (H1N1, A/Puerto Rico/8/34, согласно методу, описанному у Cottey R., Rowe C.A. и Bender, B.S. Influenza virus. Curr Protoc Immunol Chapter 19, Unit19.11–19.11.32, 2001). Каждую мышь в течение примерно 1 мин держали вертикально, слегка откинув голову назад, для снижения вероятности вытекания инокулята из ноздрей. После завершения процедуры и появления рефлекса выпрямления животных возвращали в клетку. Ежедневно осуществляли мониторинг снижения веса и симптомов болезни у мышей вплоть до дня 14 p.i. и осуществляли их

умерщвление, если снижение составляло более 20% от их первоначального веса тела (где за 0% принимали снижение в день заражения) или достигался показатель заболеваемости, составляющий 4 балла. В таблице 1 представлены детали определения показателя заболеваемости:

5 Таблица 1 – Показатель заболеваемости инфицированных PR8 мышей

Показатель заболеваемости (балл)	Клинические признаки
1	Здоровые
2	Постоянно взъерошенная шерсть на шее
3	Пилоэрекция, возможно более глубокое дыхание, снижение бдительности
4	Затрудненное дыхание, тремор и заторможенность
5	Нарушенная походка, пониженная подвижность, истощение, цианоз хвоста-ушей
6	Смерть

В конце эксперимента всех животных умерщвляли для сбора сыворотки и легких.

Получение сыворотки:

10 Собирали примерно 0,05 мл крови в содержащие гель пробирки и выдерживали 30 мин при КТ. Пробирки центрифугировали в течение 5 мин при 5500 об/мин ($3200 \times g$), сыворотку переносили в новые пробирки и хранили при -20°C до применения.

15 Осуществляли два независимых эксперимента согласно следующим протоколам:

Таблица 2 – Протокол исследования в эксперименте 1

Группа	Кол-во животных	IV-обработка	Доза МАт
1	4	-	-
2	8	FluAB_wt	1 мг/кг
3	4	FluAB_wt	0,3 мг/кг
4	8	FluAB_MLNS	1 мг/кг
5	4	FluAB_MLNS	0,3 мг/кг

Таблица 3 – Протокол исследования в эксперименте 2

Группа	Кол-во животных	IV-обработка	Доза МАт
1	9	-	-
2	10	FluAB_wt	0,3 мг/кг
3	6	FluAB_MLNS	0,3 мг/кг

Количественное определение с помощью ELISA циркулирующих МАт:

Уровни циркулирующих антител в сыворотке оценивали в дни 0 и 6. В целом, метод состоял в следующем: половину площади планшетов для ELISA

5 сенсibilизировали в течение ночи при 4°C рекомбинантным гемагглютинином (НА) из H1N1-штамма A/California/07/09 (2 мкг/мл, в ЗФР, 25 мкл/лунку). После блокады (ЗФР/1% БСА, 100 мкл/лунку, 1 ч при КТ) и двух промывок (220 мкл/лунку) промывочным раствором для ELISA (ЗФРТ), добавляли с дублированием оба разведения сыворотки (начальное разведение 1:150 для дозы

10 1 мг/кг, 1:50 для дозы 0,3 мг/кг) и стандарты антител (FluAB_MLNS и FluAB_wt, 0,1 мкг/мл) (25 мкл/лунку) и осуществляли серийные разведения (1:2 с получением 10 разведений сыворотки, 1:3 с получением 8 разведений стандартов антител). После инкубации в течение 1,5 ч при КТ планшеты промывали 4 раза

15 ЗФРТ и дополнительно инкубировали в течение 1,5 ч при КТ с меченым HRP вторичным античеловеческим антителом (0,16 мкг/мл, 25 мкл/лунку). После 4 промывок с помощью ЗФРТ в планшеты распределяли раствор субстрата (25 мкл/лунку), давали пройти реакции в течение 14 мин и блокировали с помощью 1% HCl (об./об., 25 мкл/лунку). Планшеты окончательно считывали при 450 нм с помощью спектрофотометра для количественной оценки сигнала. Уровни

20 концентраций рассчитывали с помощью основанной на методе нелинейной регрессии модели (модель с переменной крутизной наклона, четыре параметра, программное обеспечение GraphPad Prism) зависимости log(концентрации агониста) - ответ.

Анализ данных:

25 Данные представляли в виде графика и анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, версия 8.0 для Macintosh, GraphPad Software, Ла-Холья, шт. Калифорния, США), www.graphpad.com. Непрерывные переменные оценивали для определения статистически значимого различия ($p < 0,05$, 95%-ный доверительный интервал), используя общепринятый 2-

30 сторонний дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Данные о выживаемости сравнивали с использованием логрангового анализа методом Мантеля-Кокса (величина $p < 0,05$ рассматривалась в качестве

критерия статистической значимости). Объединяли данные двух независимых экспериментов, описанных выше.

Результаты:

Профилактическую активность оценивали после i.v.-введения FluAB_MLNS и FluAB_MLNS (1 и 0,3 мг/кг) мышам линии Tg32 за один день до контрольного заражения вирусом H1N1 PR8 посредством интраназального заражения.

Результаты представлены на фиг. 4А–6.

Как продемонстрировано на фиг. 4А-4Д, у мышей, обработанных FluAB_MLNS в дозе либо 1 мг/кг (фиг. 4Г), либо 0,3 мг/кг (фиг. 4Д), обнаружена меньшая потеря веса тела по сравнению с необработанными мышами (фиг. 4А) и мышами, которым инъецировали FluAB_wt (фиг. 4Б и 4В).

Более высокое защитное действие FluAB_MLNS по сравнению с FluAB_wt подтверждено при анализе выживаемости, данные о которой представлены на фиг. 5А и 5Б.

Различия в эффективности между FluAB_MLNS и FluAB_wt не коррелировали с различными уровнями циркулирующих антител в сыворотке, измеренными через 1 и 7 дней после i.v.-введения антител (фиг. 6). Следует отметить, что через 14 дней после инъекции отсутствовали поддающиеся измерению уровни циркулирующих антител (данные не представлены).

Таким образом, для FluAB_MLNS на мышах линии Tg32 продемонстрировано более высокое защитное действие в отношении H1N1 PR8 после интраназального контрольного заражения вирусом относительно применяемого для сравнения антитела FluAB_wt. Эффективность не зависела от уровней циркулирующих антител. Эти данные позволяют предположить, что повышенное взаимодействие FluAB_MLNS с hFcRn, который экспрессируется у мышей линии Tg32, опосредует также действия *in vivo*, не связанные с удлинением временем полужизни антитела, такие как повышенная эффективность с точки зрения защитной активности.

Пример 6: Комбинация антитела FluAB_MLNS с различными антивирусными препаратами

Комбинации лекарственных средств обеспечивают очевидную возможность повышения эффективности при снижении вероятности развития резистентности. Кроме того, возможное аддитивное или синергетическое действие может в

результате обеспечивать подход щадящего дозирования. Лекарственные средства против гриппа, одобренные в настоящее время FDA, включают ингибиторы нейраминидазы осельтамивир и занамивир, а также одобренный в последнее время балоксавир марбоксил, который принадлежит к классу ингибиторов эндонуклеазы.

Для оценки совместной активности FluAB_MLNS с противовирусными препаратами осельтамивиром, занамивиром или балоксавиром марбоксилом в отношении обоих репрезентивных вирусных штаммов H1N1 и H3N2 осуществляли анализ нейтрализации *in vitro* для изучения достигнутого в результате ингибирующего действия. Анализ совместного действия осуществляли с использованием графика медианного эффекта и расчета комбинационного индекса (коэффициент синергизма) (CI).

В целом, метод состоял в следующем: клетки MDCK (клетки почки кокер-спаниеля) высевали и расчета 30000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты (круглодонные, черные). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. Через 24 ч приготавливали 4-кратные разведения антитела и противовирусных препаратов (осельтамивир, занамивир или балоксавир марбоксил) в 60 мкл среды для заражения (среда MEM (фирма Sigma Aldrich, каталожный № M0644) + Glutamax (фирма Invitrogen, 41090-028) + 1 мкг/мл обработанного TPCK (тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон) трипсина (фирма Worthington Biochemical, № LS003750) + 10 мкг/мл канамицина), используя перекрестные серийные разведения 1:2 FluAB_MLNS (начиная с концентрации 166,7нМ, до получения в конечном итоге 9 горизонтальных точек) и различных противовирусных препаратов (осельтамивир, занамивир или балоксавир марбоксил), начиная с концентрации 125нМ (250нМ для занамивира), 7 вертикальных точек), согласно схеме планшета, представленного на фиг. 7.

Для каждой комбинации приготавливали три независимых планшета для создания трех повторностей для каждого соотношения комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Для каждого соединения в каждый планшет включали полученные в результате титрования образцы (а именно, по 9 точек для FluAB_MLNS и 8 точек для каждого противовирусного препарата). Раствор вируса приготавливали в концентрациях, соответствующих 120×TCID₅₀, в 60 мкл, далее разводили либо в соотношении 1:1 в MEM, либо

смешивали в соотношении 1:1 с разведениями FluAB_MLNS и инкубировали в течение 1 ч при 33°C. Клетки промывали 2 раза, используя 200 мкл/лунку MEM без добавок, с последующим добавлением либо 100 мкл только вируса, либо 100 мкл смеси FluAB_MLNS/вирус (100×TCID₅₀/лунку), и инкубировали в течение 4 ч при 33°C в атмосфере с 5% CO₂. После добавления 100 мкл/лунку среды для заражения клетки дополнительно инкубировали в течение 72 ч при 33°C в атмосфере с 5% CO₂. В день 3 после заражения приготавливали 20мкМ раствор гидрата натриевой соли MuNANA (4-MUNANA (2-(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты) (фирма Sigma-Aldrich), № 69587) в MuNANA-буфере (MES 32,5мМ/CaCl₂ 4мМ, pH 6,5) и вносили из расчета 50 мкл/лунку в черные 96-луночные планшеты. Переносили в планшеты по 50 мкл титрованного супернатанта, содержащего либо нейтрализующий агент, либо только вирус, и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Затем реакцию прекращали, добавляя 100 мкл/лунку 0,2М глицина/50% EtOH, pH 10,7. Флуоресценцию оценивали количественно при 460 нм с помощью флуориметра (фирма Bio-Tek).

Относительный уровень нейтрализации вирусов рассчитывали по формуле:

$$1 - \left(\frac{f_x - f_{min}}{f_{max}} \right),$$

в которой f_x обозначает флуоресцентный сигнал образца (клетки + вирус + FluAB_MLNS + противовирусный препарат); f_{min} обозначает минимальный флуоресцентный сигнал (только клетки без вируса); f_{max} обозначает максимальный флуоресцентный сигнал (клетки + только вирус).

Данные об относительном уровне нейтрализации использовали для осуществления количественного анализа зависимости доза-эффект для комбинаций лекарственных средств – лекарственное средство согласно методу Chou и Talalay (Chou T.C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 1984, сс. 27–55). Комбинационный индекс, пораженную фракцию (Fa) и изоболограммы получали с помощью программного обеспечения CompuSyn (фирма ComboSyn Inc., Парамус, шт. Нью-Джерси, США) (Chou T. C., Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews* 58, 2006, сс. 621–681).

Результаты представлены на фиг. 8А–26Е и описаны ниже.

Комбинация FluAB_MLNS и осельтамивира

Относительную эффективность FluAB_MLNS и осельтамивира в отношении
нейтрализации вирусов гриппа А сравнивали *in vitro* с использованием двух
5 вирусных серотипов, репрезентативных для обоих штаммов H3N2 и H1N1. Как
продемонстрировано на фиг. 8А-8Г, оба соединения при их индивидуальном
тестировании обладали одинаковой зависящей от дозы способностью полностью
ингибировать заражение клеток, обработанных независимо либо вирусом H3N3,
либо вирусом H1N1 (фиг. 8А, 8Б). Установлено, что величины IC₅₀,
10 рассчитанные из графика медианного эффекта (фиг. 8В, 8Г) после лог-
линеаризации (согласно методу, описанному у Chou T.C., Talalay P., Quantitative
analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or
enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regul. 22, 1984, сс. 27–55), находились в
наномолярном диапазоне как для FluAB_MLNS (17,9 и 15,6нМ для штаммов H3
и H1 соответственно), так и для осельтамивира (7 и 9,1нМ для штаммов H3 и H1
15 соответственно). В целом, не обнаружено существенных различий касательно
ингибирующего ответа на FluAB_MLNS инфекции, вызываемой вирусами H3 и
H1, в то время как вирус H1N1 оказался несколько более чувствительным к
ингибирующему действию осельтамивира.

20 Для тестирования воздействия комбинации FluAB_MLNS и осельтамивира
на нейтрализацию заражения MDCK-клеток вирусами H3 и H1 оба соединения
серийно разводили в указанных выше различных соотношениях и оценивали
ферментативную активность нейраминидазы (NA; в качестве показателя
содержания вируса в культуре) в присутствии различных концентраций
25 лекарственного средства и сравнивали с воздействием индивидуального
лекарственного средства. Нейтрализующее действие, измеренное в присутствии
FluAB_MLNS, существенно повышалось в случае одновременного присутствия
гетеромолярных концентраций второго соединения, что позволяет предположить
наличие синергетического, а не просто аддитивного действия, в отношении
30 инфекции, вызываемой обоими штаммами H3 и H1 вирусов (фиг. 9А-9Б).
Обнаружено небольшое различие в чувствительности вирусов H1 и H3 к
ингибирующему действию осельтамивира.

Для точного количественного определения предполагаемого синергетического действия различных соотношений в комбинации лекарственных средств данные о нейтрализации дополнительно преобразовывали на основе принципа медианного эффекта и анализировали с помощью программного обеспечения CompuSyn, как описано выше. На фиг. 10А-10Б представлен график медианного эффекта, характеризующий зависимость воздействий нескольких различных постоянных соотношений комбинации FluAB_MLNS-осельтамивир.

В программном обеспечении CompuSyn используется логарифмическое преобразование уравнения медианного эффекта для экспериментальных данных и его применяют для расчета и эффективности (IC_{50}), и так называемого комбинационного индекса (CI) различных комбинаций лекарственных средств. CI представляет собой полученный из уравнения Chou-Talalay (медианный эффект) параметр, который учитывает физико-химические свойства согласно закону действующих масс и определяется суммой двух соотношений между долей дозы лекарственного средства 1, объединенной с лекарственным средством 2, необходимой для достижения определенного действия, деленной на дозу лекарственных средств 1 и 2 при их индивидуальном применении, необходимую для получения такого же действия. Согласно этому математическому алгоритму $CI = 1$ соответствует аддитивному действию, $CI < 1$ соответствует синергизму, а $CI > 1$ соответствует антагонизму.

Как продемонстрировано на фиг. 11А-11Е и 12А-12Д, для всех протестированных соотношений комбинаций и для обоих вирусов Н1 (фиг. 11А-11Е) и Н3 (фиг. 12А-12Д), предсказанные величины CI в пределах всего диапазона ингибированной фракции описывались кривой, лежащей значительно ниже 1, для всех соотношений комбинаций лекарственных средств, и фактические экспериментальные точки различных объединенных концентраций также находились в диапазоне ниже 1 практически для всех комбинаций. В совокупности эти данные свидетельствуют о выраженном синергетическом действии FluAB_MLNS и осельтамивира при их объединении.

В альтернативном подходе указанные данные можно описывать с помощью диаграмм изобол (изоболлограмм), которые позволяют сравнивать эквипотентные концентрации как индивидуальных, так и применяемых в

комбинации лекарственных средств. Как продемонстрировано на фиг. 13 и 14, распределение величин IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для трех различных соотношений комбинаций находились значительно ниже линий изобол, соединяющих соответствующие величины IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} для протестированных индивидуально лекарственных средств как в случае Н1 (фиг. 13А-13В), так и в случае Н3 (фиг. 14А-14В), что свидетельствует об устойчивом синергизме (в то время как аддитивное действие и антагонизм должны описываться эквипотентными точками, локализованными либо на изоболе, либо выше изоболы для индивидуального лекарственного средства соответственно).

Комбинация FluAB_MLNS и занамивира

Относительную эффективность FluAB_MLNS и занамивира в отношении нейтрализации вирусов гриппа А также сравнивали *in vitro* на двух вирусных серотипах, репрезентативных для обоих штаммов, Н3N2 и Н1N1. Как продемонстрировано на фиг. 15А-15Г, оба соединения при их индивидуальном тестировании обладали зависящей от дозы способностью полностью ингибировать заражение клеток, обработанных независимо либо вирусом Н3N3, либо вирусом Н1N1. Относительные рассчитанные величины IC_{50} составляли 23,1-24,4 нМ для FluAB_MLNS и 10,7-13,7 нМ для занамивира.

Касательного совместного действия FluAB_MLNS и занамивира на фиг. 16А-16Б продемонстрировано, что аналогично осельтамивиру, занамивир значительно повышал ингибирующую способность FluAB_MLNS в отношении обоих вирусов Н1 и Н3.

Количественную оценку синергетического действия также осуществляли с помощью CompuSyn и описанного выше принципа медианного эффекта. На фиг. 17А-17Б представлены графики медианного эффекта, характеризующие зависимость воздействий FluAB_MLNS и занамивира. Рассчитанные величины CI для FluAB_MLNS и занамивира представлены на фиг. 18А-18Г и 19А-19Г, и они четко демонстрируют синергетическое действие обоих лекарственных средств как в отношении вируса Н1 (фиг. 18А-18Г), так и вируса Н3 (фиг. 19А-19Г), о чем свидетельствует то, что величины составляют менее 1 для всех протестированных экспериментальных точек. В соответствии с этим, касательно обоих штаммов вирусов изоболограммы свидетельствуют о сильном синергетическом действии на уровне величин IC_{50} , IC_{75} и IC_{90} (что

продемонстрировано на фиг. 20А-20В и 21А-21В), которые все оказались существенно ниже величин IC для лекарственного средства при его индивидуальном применении.

Комбинация FluAB_MLNS и балоксавира марбоксила

Одобренный в последние годы ингибитор эндонуклеазы балоксавир марбоксил первоначально сравнивали с FluAB_MLNS индивидуально на обоих штаммах H1 и H3 аналогично методу, описанному выше для осельтамивира и занамивира. Результаты представлены на фиг. 22А-22Г. Относительные рассчитанные величины IC₅₀ составляли 20,1-15,4нМ для FluAB_MLNS и 4,9-2,3нМ для балоксавира марбоксила.

Хотя балоксавир обладает другим механизмом действия в отношении ингибирования репликации вируса по сравнению с ингибиторами NA, лекарственное средство все еще обладало способностью значительно повышать ингибирующую активность FluAB_MLNS с четко выраженным синергетическим действием (фиг. 23А-23Б). Данные об ингибировании, полученные с использованием различных соотношений в комбинации, применяли для расчета и построения графика медианного эффекта с помощью программного обеспечения CompuSyn, и определяли тип взаимодействия лекарственное средство – лекарственное средство согласно описанному выше методу (фиг. 24А-24Б). Рассчитанные величины CI для FluAB_MLNS и балоксавира марбоксила (фиг. 25А-25Е) четко демонстрируют наличие синергетического действия между двумя лекарственными средствами в отношении обоих вирусов H1 и H3, о чем свидетельствует то, что величины составляют менее 1 для большей части протестированных экспериментальных точек. Изоболограммы свидетельствуют о сильном и полном синергетическом действии, установленном на уровне величин IC₅₀, IC₇₅ и IC₉₀ (фиг. 26А-26Е).

Таким образом, установлено, что нейтрализующая активность FluAB_MLNS в отношении обоих штаммов H1 и H3 синергетически повышалась при использовании различных противовирусных препаратов, а именно: ингибиторов NA осельтамивира и занамивира, а также ингибитора эндонуклеазы балоксавира марбоксила.

Пример 7: Клиническое исследование FluAB_MLNS

Фазу 1/2 рандомизированного плацебо-контролируемого исследования проводили для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетических характеристик, иммуногенности и эффективности FluAB_MLNS при его применении для лечения и предупреждения заболевания гриппом А.

FluAB_MLNS содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9. Исследование состояло из 3 частей:

Часть А: Двойное слепое исследование для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетических характеристик и иммуногенности вводимого в однократной возрастающей дозе FluAB_MLNS на 100 здоровых взрослых субъектах.

Часть Б: Открытое исследование для оценки безопасности, фармакокинетических характеристик и иммуногенности FluAB_MLNS после введения второй дозы примерно через 1 год после начальной дозы (т.е. применяемой в части А исследования) примерно на 30-80 субъектах, участвовавших в проведении части А исследования.

Часть В: Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование для оценки безопасности, переносимости, эффективности, фармакокинетических характеристик и иммуногенности FluAB_MLNS при его применении для лечения и предупреждения заболевания гриппом А в сравнении с плацебо. Количество участников составляло вплоть до 2760. В исследовании оценивали воздействие FluAB_MLNS в сравнении с плацебо на связанные с гриппом А параметры у субъектов с подтвержденным заболеванием гриппом А. Указанные параметры включали серьезность заболевания, продолжительность заболевания, величину вирусной нагрузки в назофарингеальных секретах во время болезни гриппом А. Кроме того, исследование проводили также для:

- оценки воздействия FluAB_MLNS на потенциальные биомаркеры ответа хозяина после перенесенного заболевания гриппом А;
- мониторинга развития резистентности вируса к FluAB_MLNS у субъектов с заболеванием гриппом А;

- оценки потенциальной взаимосвязи между генетическими полиморфизмами у субъекта и механизмами действия и/или фармакокинетическими характеристиками FluAB_MLNS;

- определения частоты посещения медицинских учреждений из-за заболевания гриппом А;

- определения воздействия FluAB_MLNS на период времени потери трудоспособности и производительности из-за заболевания гриппом А.

FluAB_MLNS оценивали с точки зрения предупреждения заболевания гриппом А у здоровых взрослых людей с низким риском развития серьезных связанных с гриппом осложнений. FluAB_MLNS характеризуется высокой эффективностью *in vitro* в отношении широкого разнообразия сезонных и пандемических штаммов вируса гриппа А и эффективностью в отношении предупреждения других летальных вызываемых гриппом А инфекций на животных моделях. Кроме того, эпитоп, распознаваемый FluAB_MLNS, является высоко консервативным среди вирусов гриппа А и представляет собой высокий барьер для развития резистентности *in vitro*.

Указанные объединенные фазы 1/2 рандомизированного плацебо-контролируемого впервые проводимого на людях исследования предназначены для оценки безопасности, фармакокинетических характеристик (ФК) и эффективности FluAB_MLNS в отношении предупреждения заболевания гриппом А у здоровых взрослых людей, не имеющих факторов риска серьезных осложнений из-за вызываемой вирусом гриппа инфекции. Части А и Б исследования предназначены для сбора информации о безопасности и переносимости FluAB_MLNS, а также релевантных данных о профиле ФК и образовании антител к лекарственному препарату (ADA). Часть В исследования предназначена для оценки эффективности FluAB_MLNS в отношении предупреждения заболевания гриппом А и для сбора дополнительных данных от безопасности, переносимости и ФК. Потенциальные риски основаны на общих рисках безопасности, имеющих место при применении МАт, таких как: анафилаксия и другие серьезные аллергические реакции, заболевание иммунного комплекса и реакции, связанные с местом инъекции.

В присутствии инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, существует теоретический риск антителозависимого усиления (ADE) болезни. Осуществляли

мониторинг субъектов в отношении важных потенциальных рисков, включая оценку безопасности в присутствии инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, и осуществляли общепринятые мероприятия по фармаконадзору и минимизации рисков.

5 В указанном исследовании принимали участие здоровые взрослые люди возрастом 18-64 года без факторов риска серьезных осложнений из-за гриппозной инфекции, не подвергавшиеся вакцинации против предстоящего сезона гриппа.

В этом исследовании в качестве контроля применяли плацебо.

10 Для соответствующей оценки способности FluAB_MLNS предупреждать заболевание гриппом А опыт с введением лекарственного средства осуществляли до сезона гриппа. В этом контексте ожидалось, что данные, полученные в процессе части А исследования, обеспечат получение достаточных сведений о безопасности и ФК, которые можно распространять на более
15 крупную популяцию здоровых взрослых людей.

В этом опыте выбран диапазон однократных фиксированных доз, возрастающих с 60 до 1800 мг (60, 300, 1200, 1800 мг) FluAB_MLNS, вводимых ИМ. Рекомендованная наиболее высокая начальная доза для людей представляла собой фиксированную дозу, составлявшую 5 мг/кг или 300 мг.

20 План исследования

Исследование представляло собой фазу 1/2 рандомизированного плацебо-контролируемого изучения FluAB_MLNS, вводимого внутримышечно (ИМ) здоровым взрослым волонтерам возрастом от 18 до 64 лет, не подвергавшимся
25 вакцинации против предстоящего сезона гриппа. Исследование планировали для оценки безопасности, переносимости, ФК, иммуногенности и эффективности FluAB_MLNS в отношении предупреждения заболевания гриппом А.

Исследование включало 3 части:

- часть А: фаза 1, двойное слепое исследование с возрастающей однократной дозой FluAB_MLNS;
- 30 • часть Б: фаза 1, открытое исследование безопасности и ФК после введения второй дозы FluAB_MLNS;

• часть В: фаза 2, двойное слепое исследование для оценки эффективности FluAB_MLNS в отношении предупреждения внебольничного заболевания гриппом А.

5 Данные, собранные во время части А исследования, позволяют получать сведения о безопасности и ФК для распространения на более крупную популяцию здоровых взрослых людей для подтверждения концепции. План изучения безопасности, включающий надзор SRC в части А и независимый DMC в части В, разработан для обеспечения тщательной оценки данных о безопасности и раннего обнаружения потенциальных угрожающих безопасности
10 сигналов.

Промежуточный анализ безопасности, эффективности и отсутствия эффективности проводят, когда становятся доступными данные, полученные примерно в течение половины первого сезона гриппа.

15 В том случае, если субъекты имеют серьезное заболевание гриппом, то предлагается противовирусная терапия, если исследователь сочтет это целесообразным.

Продолжительность участия в исследовании

Часть А: Установленная общая продолжительность исследования для каждого субъекта, включая скрининг и последующее наблюдение, составляла
20 примерно 13 месяцев.

Часть Б: Установленная общая продолжительность исследования для каждого субъекта составляла примерно 6 месяцев для части Б и вплоть до 19 месяцев для обеих частей А и Б вместе.

25 Часть В: Установленная общая продолжительность исследования для каждого субъекта, включая скрининг и последующее наблюдение, составляла примерно 8 месяцев.

Часть А

Каждый из 25 субъектов в 4 когортах получал однократную дозу FluAB_MLNS или плацебо путем одной (или нескольких) внутримышечной(ых)
30 (IM) инъекции(й) для оценки безопасности и переносимости FluAB_MLNS по сравнению с плацебо. Режимы дозирования для 4 когорт представлены в таблице А.

Таблица А: Обобщение сведений о когортах, участвующих в части А исследования

Когорта	Субъекты		Доза FluAB_MLNS или соответствующая доза плацебо
	FLUAB_MLNS	плацебо	
1	20	5	60 мг (1 инъекция × 0,4 мл)
2	20	5	300 мг (1 инъекции × 2 мл)
3	20	5	вплоть до 1200 мг (2 инъекции × 4 мл)
4	20	5	вплоть до 1800 мг (3 инъекции × 4 мл)

Удовлетворяющих требованиям субъектов включали в 3 последовательные когорты, которые случайным образом разделяли в соотношении 4:1 касательно получения либо FluAB_MLNS, либо плацебо. Первых двух субъектов в каждой когорте случайным образом разделяли в соотношении 1:1 касательно получения либо FluAB_MLNS, либо плацебо. После наблюдения в течение 24 ч за субъектами всех остальных субъектов в каждой когорте дозировали в один и тот же день и оставляли в месте проведения клинического исследования на 48 ч после введения дозы.

Осуществляли наблюдение за симптомами местной переносимости, которые не исчезали ко дню 3, до их разрешения или до дня 14 (в зависимости от того, что имело место раньше). Параметры местной переносимости включают боль/болезненность, отек, покраснение, гематомы и зуд в области инъекции.

Во время исследования осуществляли тщательный мониторинг субъектов в отношении гриппоподобного заболевания (ILI). Начиная со дня 3, субъекты дважды в неделю заполняли опросник для наблюдения за симптомами ILI с использованием электронного устройства. Субъекты продолжали участвовать в исследовании примерно в течение одного года для завершения оценки безопасности, ФК и ADA.

Результаты:

Сто (100) субъектов получали однократную дозу FluAB_MLNS (N=80) или плацебо (N=20). Для всех когорт собирали предварительные полученные в слепом опыте данные о безопасности и собирали данные о ФК для когорт, в которых производили обработку в дозах 300 и 1200 мг.

Образцы сыворотки для ФК-анализа собирали в конкретные дни визитов в течение 52 недель. Концентрации FluAB_MLNS в сыворотке определяли с помощью электролюминесцентного метода, принятого для платформы Meso Scale Discovery (MSD). ФК-параметры оценивали с использованием стандартных

некомпарментальных методов, заложенных в программное обеспечение WinNonlin® 8.2 (фирма Certara L.P., Принстон, шт. Нью-Джерси). ФК-параметры FluAB_MLNS обобщали с использованием описательной статистики.

В течение всего исследования осуществляли мониторинг нежелательных явлений, клиническую лабораторную оценку, медицинский осмотр и ЭКГ. 5
Оценку переносимости в месте инъекции осуществляли примерно через 30 мин, 2 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч и 1 недели после введения дозы.

Дозирование хорошо переносилось; у 6% (6/100) субъектов обнаружены слабые реакции в месте инъекции, которые, как правило, в целом исчезали в 10 течение 48 ч. В течение 12 недель после дозирования большинство нежелательных явлений (АЕ) (110/112/124/126; 98,24%) (АЕ) были по природе от слабых до умеренных, не отмечено никаких серьезных АЕ, и ни один субъект не прекратил участие в исследовании из-за АЕ. На основе доступных данных 15
сделано заключение о том, что экспозиция (C_{max} и AUC) для доз FluAB_MLNS от 300 до 1200 мг повышалась пропорционально дозе. ФК-профиль FluAB_MLNS представлен на фиг. 34, и он соответствует профилю IgG с удлинённым временем полужизни. Сбор ФК-данных продолжали в течение 52 недель после введения дозы (см., например, фиг. 35).

FluAB_MLNS хорошо переносилось здоровыми субъектами после введения 20 в виде однократных IM-доз вплоть до 1800 мг. Предварительные данные о ФК-профиле FluAB_MLNS позволяют рекомендовать дозирование один раз в сезон.

ФК-данные для всех обработанных групп в течение 20 недель представлены на фиг. 36 и 37. Обнаружено приблизительно пропорциональное дозе повышение 25
 C_{max} и AUC_{D0-140}, и оцененная (предварительная) величина $t_{1/2}$ составляла примерно 58 дней.

Часть Б

Субъекты, завершившие участие в части А исследования, во время визита в день окончания опыта были проинформированы о том, вводили им 30
лекарственное средство или плацебо. Субъекты, которым вводили FluAB_MLNS, получали возможность дать согласие на участие в части Б. Удовлетворяющие требованиям субъекты (≥ 30) получали вторую дозу (IM) FluAB_MLNS примерно через 12 месяцев после начальной дозы для оценки иммуногенности, безопасности и ФК FluAB_MLNS после повторного дозирования.

Субъекты оставались в месте клинического исследования в течение минимум 2 ч после введения дозы для оценки безопасности и местной переносимости FluAB_MLNS и принимали участие в исследовании в течение 24 недель вплоть до завершения оценок безопасности, ФК и ADA.

- 5 Решения о приостановке дозирования или прекращении участия отдельных субъектов в части В исследования лекарственного средства принимались в соответствии с заранее установленными правилами прекращения приема. При удовлетворении правилам остановки дозирование приостанавливается. Субъекты продолжали заполнять опросник для наблюдения за симптомами с
- 10 использованием электронного устройства два раза в неделю до конца исследования для мониторинга гриппоподобных заболеваний (ILI).

Часть В

- Часть В исследования предназначена для оценки безопасности и эффективности FluAB_MLNS в отношении предупреждения внебольничного
- 15 заболевания гриппом А здоровых взрослых людей. Выбор доз и включение в часть В исследования начинали после того, как были обобщены доступные данные о ФК и безопасности, собранные в части А, минимум через 45 дней для когорты 1 и минимум через 21 день для когорты 2. Обобщали также доступные данные о безопасности для когорт 3 и 4.

- 20 ФК-данные, полученные в части А исследования, обобщали для выбора дозы для изучения в части В исследования. В части В исследования оценивали вплоть до двух уровней доз, что позволяло осуществлять анализы экспозиция-ответ и выбирать дозу для дополнительных исследований в фазе 3. Дозы, отобранные для оценки в части В, основывались на доступных ФК-данных,
- 25 полученных в части А, для поддержания минимальной концентрации FluAB_MLNS в сыворотке 8 мкг/мл по меньшей мере в течение 6 месяцев после дозирования. Случайным образом отбирали вплоть 1380 субъектов и их включали в группы, которые получали FluAB_MLNS или плацебо.

- На стадии В можно оценивать один или два уровня доз. Если оценивали два
- 30 уровня доз, то удовлетворяющих требованиям субъектов случайным образом разделяли на группы, которые в день 1 получали либо FluAB_MLNS, либо плацебо, в соотношении 2 (n=460) : 2(n=460) : 1(n=230) : 1(n=230). Если оценивали один уровень доз, то субъектов случайным образом разделяли в

соотношении 1(n=460) : 1(n=460). Для каждого уровня доз количество инъекций и объем соответствовали количеству инъекций и объему плацебо. Субъекты оставались в месте проведения клинического исследования в течение минимум 2 ч после введения дозы для оценки безопасности и местной переносимости

5 FluAB_MLNS в области(ях) инъекции(ий) и завершения оценок.

Субъекты самостоятельно осуществляли активный мониторинг ИЛИ на протяжении всего исследования. Субъекты дважды в неделю заполняли опросник для наблюдения за симптомами ИЛИ с использованием электронного устройства. Субъекты, имеющие ИЛИ, проходили обследование в стационаре, 10 самостоятельно сообщали о серьезности симптомов гриппа и заполняли WPAI-анкеты, и за ними велось наблюдение. Субъектов, имеющих симптомы, соответствующие ИЛИ, определяли как имеющих следующие параметры:

- ≥ 1 респираторного симптома (кашель, боль в горле, ринорея, заложенность носа)

15 и

- ≥ 1 системного симптома (лихорадка [температура в ротовой полости $>38^{\circ}\text{C}$ ($100,4^{\circ}\text{F}$)], озноб, миалгия, головная боль, недомогание, усталость).

При осуществлении всех частей исследования собирали образцы крови для определения присутствия/отсутствия антител к лекарственному препарату 20 (ADA) и их титров. Образцы также изучали в отношении нейтрализующего потенциала антитела к FluAB_MLNS в соответствии с принятым методом.

Все субъекты осуществляли контрольный визит примерно через 4 и 12 недель после получения исследуемого лекарственного средства и примерно через 2 недели после завершения сезона гриппа для оценки безопасности, ФК и 25 ADA. Если в зависимости от уровня доз требовалась вторая инъекция FluAB_MLNS, то вторую инъекцию осуществляли во время визита на неделе 12. Субъекты находились в клинике в течение минимум 2 ч после введения дозы для оценки безопасности и местной переносимости FluAB_MLNS в месте(ах) инъекции(й).

30 Промежуточный анализ проводили, когда данные примерно за половину первого сезона гриппа становились доступными для части В и формировали основу для принятия решения о завершении исследования в конце сезона или продолжении исследования во втором сезоне гриппа.

При осуществлении части В исследования окончательный визит определяли на основе приблизительного окончания сезона гриппа в полушарии. Для участников из стран южного полушария, где окончанием сезона гриппа считается 30 сентября, окончательные визиты должны завершаться примерно к середине октября. Для стран-участниц из северного полушария, где окончанием сезона гриппа считается 30 апреля окончательные визиты должны завершаться примерно к середине мая.

Только при осуществлении части В собирали образец крови для генотипирования Fc-рецепторов для IgG (FcγR) и аллелей IgG1 с целью оценки потенциальных взаимодействий с механизмом действия FluAB_MLNS или ФК. Субъекты давали информированное согласие специально для генотипического анализа.

Популяция субъектов

В момент рандомизации субъекты имели возраст от 18 до 64 лет. Субъекты, участвующие в частях А и Б исследования, представляли собой здоровых мужчин и женщин без острых или хронических медицинских состояний. Для включения в часть В субъекты должны иметь хорошее состояние здоровья по данным истории болезни (например, любые хронические заболевания, такие как гипертония, гиперлипидемия, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, тревога или депрессия, должны стабилизироваться приемом соответствующей дозы лекарственного средства), и не иметь никаких клинически значимых противопоказаний по результатам физического обследования, ЭКГ в 12 отведениях, по жизненно важным показателям и лабораторным показателям. Индекс массы тела в частях А и Б исследования составлял от 18 кг/м² до 32 кг/м² и в части В составлял от 18 кг/м² до 35 кг/м². Женщины должны иметь отрицательный тест на беременность или у них должен быть подтвержден пост-менапаузальный статус. Мужчины, имеющие женщин-партнеров детородного потенциала, должны дать согласие на использование контрацепции до последнего контрольного визита или быть ранее подвергнуты вазэктомии с документальным подтверждением азооспермии.

Пациенты, принимающие участие в частях А и Б исследования, не были курильщиками. Пациенты, принимающие участие в части А исследования,

должны дать согласие на отказ от алкоголя за 72 ч и от кофе за 24 ч до введения исследуемого лекарственного средства. Пациенты, включенные в часть Б исследования, получали FluAB_MLNS примерно за 12 месяцев до момента включения и после завершения части А исследования.

5 Процедуры исследования

Часть А

Скрининг:

 Скрининг осуществляли не более чем за 4 недели до визита в день 1, и он включал письменное информированное согласие, определение приемлемости
10 включения, сбор демографических данных и историю болезни, а также медицинский осмотр (включая жизненно важные показатели), лабораторные анализы, электрокардиограмму в 12 отведениях (ЭКГ) и другие оценки в соответствии с протоколом оценки для части А исследования (фиг. 27А-27Б).

 Период нахождения в стационаре (день 1 - день 3):

15 Все субъекты были госпитализированы в клинический исследовательский центр в день -1 и находились в нем по меньшей мере в течение 12 ч до дозирования и 48 ч после дозирования для наблюдения, проведения лабораторных анализов и отбора образцов для ФК. Удовлетворяющих требованиям субъектов случайным образом разделяли на получающих
20 FluAB_MLNS или плацебо в день 1. Образцы сыворотки и образцы из носоглотки для ФК отбирали согласно схеме моментов времени осуществления фармакокинетических оценок (фиг. 31). Субъектов выписывали после того, как на 3-й день были проведены все запланированные в исследовании оценки.

Период последующих наблюдений:

25 Субъекты возвращались в место проведения клинических исследований для персональных оценок в соответствии с протоколом оценки для части А исследования (фиг. 27А-27Б), включающих (но, не ограничиваясь только ими) медицинский осмотр (включая жизненно важные показатели), ЭКГ в 12 отведениях, лабораторные анализы (включая безопасность, ФК и ADA), осмотр в
30 отношении АЕ и при необходимости получение сведений о сопутствующих медицинских процедурах. Образцы сыворотки и образцы из носоглотки для ФК отбирали согласно схеме моментов времени осуществления фармакокинетических оценок (фиг.31). Субъекты заполняли опросник для

наблюдения за симптомами ILI с использованием электронного устройства два раза в неделю до конца исследования. Если у субъектов наблюдался ILI, то за ними осуществляли наблюдение в соответствии с теми же положениями, что и в части В, в соответствии с протоколом мониторинга гриппоподобных

5 заболеваний (фиг. 30).

Часть Б

Скрининг:

При условии, что оценки данных о безопасности, ФК и эффективности из частей А и В исследования поддерживают перспективу дальнейшего
10 исследования продукта, субъекты, получавшие FluAB_MLNS, могут перейти к участию в части Б исследования.

Детали рандомизации субъектов были раскрыты при визите по окончании части А исследования, и субъекты, которые получали FluAB_MLNS, могли согласиться пройти оценку на предмет возможности получения второй дозы
15 FluAB_MLNS примерно через 12 месяцев после первоначальной дозы. Скрининговые оценки в соответствии с протоколом оценки для части Б (фиг. 28А-28Б) проводили не более чем за 4 недели до визита в день 1.

Дозирование (день 1):

Удовлетворяющие требованиям субъекты получали дозу FluAB_MLNS в
20 день 1. Субъекты оставались в клинике в течение минимум 2 ч после введения дозы для оценки безопасности и местной переносимости FluAB_MLNS и завершения оценок, предусмотренных в протоколе оценки для части Б исследования (фиг. 28А-28Б).

Период последующих наблюдений:

25 Субъекты возвращались в место проведения клинических исследований для персональных оценок в соответствии с протоколом оценки для части Б исследования (фиг. 28А-28Б), включающих (но, не ограничиваясь только ими) медицинский осмотр (включая жизненно важные показатели), лабораторные анализы (включая безопасность, ФК и ADA), осмотр в отношении АЕ и при
30 необходимости получение сведений о сопутствующих медицинских процедурах. Субъекты заполняли опросник для наблюдения за симптомами ILI с использованием электронного устройства два раза в неделю до конца исследования. Если у субъектов наблюдался ILI, то за ними осуществляли

наблюдение в соответствии с теми же положениями, что и в части В, в соответствии с графиком мониторинга гриппоподобных заболеваний (фиг. 30).

Часть В

Скрининг:

5 Скрининг осуществляли не более чем за 4 недели до визита в день 1, и он включал письменное информированное согласие, определение приемлемости включения, сбор демографических данных и истории болезни, а также медицинский осмотр (включая жизненно важные показатели), лабораторные анализы, электрокардиограмму в 12 отведениях (ЭКГ) и другие оценки в соответствии с протоколом оценки для части В исследования (фиг. 29А-29Б).

Дозирование (день 1):

Если изучали два уровня доз, то удовлетворяющих требованиям субъектов случайным образом разделяли на группы, которые в день 1 получали либо FluAB_MLNS, либо плацебо, в соотношении 2 (n=460) : 2(n=460) : 1(n=230) : 1(n=230). Если оценивали один уровень доз, то субъектов случайным образом разделяли в соотношении 1(n=460) : 1(n=460). Если согласно выбранному уровню доз требовалась вторая инъекция FluAB_MLNS, то вторую инъекцию вводили во время визита через 12 недель. Для каждого уровня доз количество инъекций и объем соответствовали количеству инъекций и объему плацебо.

20 Субъекты оставались в месте проведения клинического исследования в течение минимум 2 ч после введения дозы для оценки безопасности и местной переносимости в месте(ах) инъекции(ий) и завершения оценок в соответствии с протоколом оценки для части В исследования (фиг. 29А-29Б).

Период последующих наблюдений:

25 Субъекты возвращались в место проведения клинических исследований для оценок в клинических условиях в соответствии с протоколом оценки для части В исследования (приложение 4). Субъекты заполняли опросник для наблюдения за симптомами ILI с использованием электронного устройства два раза в неделю до конца исследования. У субъектов с симптомами, соответствующими ILI, которых определяли как имеющих следующие параметры: ≥ 1 респираторного симптома (кашель, боль в горле, ринорея, заложенность носа) и ≥ 1 системного симптома (лихорадка, озноб, миалгия, головная боль, недомогание, усталость), в период наблюдений должны были сообщать о симптомах в день их появления

для клинической оценки в соответствии с протоколом мониторинга гриппоподобных заболеваний (фиг. 30).

Клиническая оценка включала (но, не ограничиваясь только ими) медицинский осмотр (включая жизненно важные показатели), лабораторное тестирование (включая безопасность), вирусологическую оценку мазка из носоглотки, анализ образцов крови в отношении ФК и ADA, осмотр в отношении АЕ и при необходимости получение сведений о сопутствующих медицинских процедурах. Субъекты также самостоятельно сообщали о серьезности симптомов гриппа и заполняли опросник WPAI в соответствии с протоколом мониторинга гриппоподобных заболеваний (фиг. 30). WPAI - это проверенная, сообщенная пациентом количественная оценка прогулов (пропущенное рабочее время), опозданий (снижение эффективности на рабочем месте), снижения производительности труда и ухудшения активности из-за конкретной проблемы со здоровьем.

Субъекты, у которых диагностировано ILI, заполняли опросник WPAI из 6 пунктов по ILI-D1 и ILID8 (см. фиг. 30).

Опросник по серьезности симптомов гриппа

Субъекты проводили самооценку системных и респираторных симптомов, связанных с гриппом (т.е. кашель, боль в горле, головная боль, заложенность носа, лихорадка или озноб, боль в мышцах или суставах и усталость). Они оценивали серьезности их симптомов по 4-балльной шкале (0, нет; 1, легкая степень; 2, умеренная; 3, серьезная). Эта информация записывалась в электронное устройство два раза в день с ILI-D1 по ILI-D10 (10 дней включительно) в течение периода мониторинга гриппоподобных заболеваний (фиг. 30).

Титр антитела против вируса гриппа А

При осуществлении всех частей исследования собирали образцы крови для определения титров антитела против вируса гриппа А, используя стандартные методы согласно протоколам оценок для частей А, Б и В исследования (фиг. 27А/27Б, 28 и 29, соответственно) и гриппоподобных заболеваний. Протокол мониторинга представлен на фиг. 30. Подробная информация об обработке образцов приведена в лабораторном руководстве.

Наблюдение за резистентностью

При осуществлении всех частей исследования для всех субъектов, которые получали исследуемое лекарственное средство и имели лабораторно подтвержденную инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А, осуществляли

5 наблюдение за резистентностью для обнаружения возможного возникновения резистентности к FluAB_MLNS согласно протоколу мониторинга гриппоподобного заболевания (фиг. 30). Образцы назофарингеальных мазков субъектов с подтвержденной вызываемой вирусом гриппа А инфекцией

10 подвергали углубленному анализу последовательности гена НА для определения аминокислотных вариантов. Для оценки возникновения антивирусной резистентности культивировали вирус из субъектов с лабораторно

подтвержденной инфекцией, вызываемой вирусом гриппа А, и осуществляли фенотипический анализ *in vitro* противовирусной активности FluAB_MLNS в отношении вируса, который культивировали из субъектов с подтвержденным

15 IAV. Для субъектов, из организма которых не удалось культивировать IAV, создавали рекомбинантный вирус, содержащий ген НА из позитивных по вирусу гриппа А субъектов, используя принятые методы «обратной» генетики, и рекомбинантные вируса подвергали фенотипическому анализу.

Применяемые для исследования биомаркеры

20 При осуществлении части В и в процессе мониторинга ILI образцы следует собирать согласно протоколу оценок (фиг. 29А-29Б и 30 соответственно) для изучения потенциальных биомаркеров инфекции или ответа хозяина. Подробности отбора образцов и их обработки включены в лабораторное

руководство.

Генотипирование

25 Подписанное и датированное информированное согласие субъектов, специально предназначенное для оценки генотипирования, получали перед проведением любых сборов образцов. Только при осуществлении части В собирали образец крови для генотипирования Fc-рецепторов для IgG (FcγR) и

30 аллелей IgG1 согласно протоколу оценки, представленному на фиг. с целью оценки потенциальных взаимодействий с механизмом действия FluAB_MLNS или ФК.

Продукт

FluAB_MLNS получали в виде 300 мг лиофилизированного твердого вещества в стеклянном флаконе с герметичной пробкой. После восстановления до получения 150 мг/мл с помощью USP-воды для инъекций, вводимый

5 представляющий собой лекарственное средство продукт содержал 20мМ гистидин, 5,3% сахарозы и 0,02% PS80, pH 6. FluAB_MLNS инъецировали внутримышечно. Стандартная доза рассчитывалась на основе объема (0,8-4 мл на инъекцию). Никаких специальных процедур для безопасного обращения с FluAB_MLNS не требовалось. FluAB_MLNS хранили в безопасной среде с

10 контролируемой температурой.

В качестве плацебо применяли стерильный, не содержащий консервантов 0,9%-ный физиологический раствор для IM-инъекций.

Статистические методы

Часть А и часть Б

15 Статистический анализ носил в основном описательный характер. Все данные исследования представлены в перечнях данных. В сводных таблицах представлены результаты по когортам для каждой дозы FluAB_MLNS и плацебо, при необходимости. Описательная статистика представлена для непрерывных переменных, а частоты и проценты представлены для категориальных и

20 обычных переменных. Проценты основаны на количестве не пропущенных значений в дозируемой группе. Можно оценить влияние ADA на ФК и связь с АЕ и SAE.

Часть В

Основным популяционным анализом для оценки эффективности является

25 полный набор анализов (FAS), который включает всех рандомизированных субъектов, получавших в любом количестве исследуемое лекарственное средство. Основной конечной точкой эффективности является доля субъектов с лабораторно подтвержденным (с помощью ОТ-ПЦР) заболеванием гриппом А, которых определяли как имеющих следующие параметры: ≥ 1 респираторного

30 симптома и ≥ 1 системного симптома. Основной анализ состоит из тестов в отношении превосходства FluAB_MLNS по сравнению с плацебо, основанных на снижении уровня заболеваемости гриппом А, определенного согласно протоколу. Если оценивали два уровня доз, то следующие гипотезы проверялись

в соответствии с принципом последовательного тестирования на основе двустороннего критерия с уровнем значимости 0,05. Если нулевая гипотеза не отклонялась, то формальное последовательное тестирование прекращалось, а для остальных гипотез сообщалась только номинальная значимость:

5 1. превосходство FluAB_MLNS при уровне дозы 2 (высоком) относительно плацебо на основе частоты заболеваний гриппом А, определенной согласно протоколу;

10 2. превосходство FluAB_MLNS при уровне дозы 1 (низком) относительно плацебо на основе частоты заболеваний гриппом А, определенной согласно протоколу.

Если в части В исследовали два уровня доз, то размер выборки для каждой группы, обработанной FluAB_MLNS, составлял 460 субъектов, 230 субъектов в каждой соответствующей обработанной плацебо группе, что обеспечивало примерно 80%-ную мощность для обнаружения 70%-ного снижения установленной протоколом частоты заболеваний (с 4,5% до 1,35%) между плацебо-группой и FluAB_MLNS-группой соответственно с использованием 2-стороннего критерия с уровнем значимости 0,05. В целом в исследование включено примерно 1380 субъектов.

20 Если оценивали только один уровень доз, то в исследование включали примерно 920 субъектов. Размер выборки для обработанной FluAB_MLNS группы составлял 460 субъектов и для обработанной плацебо группы составлял 460 субъектов, что обеспечивало примерно 80%-ную мощность для обнаружения 70%-ного снижения установленной протоколом частоты заболеваний (с 4,5% до 1,35%) между плацебо-группой и VIR-2482-группой соответственно с использованием 2-стороннего критерия с уровнем значимости 0,05.

25 Если промежуточный анализ обуславливал необходимость включения дополнительных субъектов, то включали примерно 1380 дополнительных субъектов, если оценивали два уровня доз. Размер общей исследуемой выборки составлял примерно 2760 субъектов. Если оценивали только один уровень доз, то включали примерно 920 дополнительных субъектов. Размер общей исследуемой выборки составлял примерно 1840 субъектов. Размер выборки для FluAB_MLNS-группы, составляющий 920 субъектов, для плацебо-группы, составляющий 920 субъектов, обеспечивал примерно 80%-ную мощность для

обнаружения 70%-ного снижения установленной протоколом частоты заболеваний (с 2,25% до 0,675%) между плацебо-группой и FluAB_MLNS-группой соответственно с использованием 2-стороннего критерия с уровнем значимости 0,05.

5 Конечные точки

Часть А

Первичная конечная точка представляет собой:

• Безопасность и переносимость FluAB_MLNS, для измерения которых использовали частоту нежелательных явлений, связанных с лечением (TEAE), и клинические оценки.

Вторичные конечные точки представляют собой:

• Измеренные после введения в однократной дозе FluAB_MLNS ФК-параметры в сыворотке (например, C_{max} , C_{last} , T_{max} , T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{exp}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z/F , CL/F).

• Частоту встречаемости и титры (если это применимо) в сыворотке ADA против FluAB_MLNS.

Конечные точки исследования могут включать:

• Измеренные после введения в однократной дозе FluAB_MLNS ФК-параметры в назофарингеальном секрете (например, C_{max} , C_{last} , T_{max} , T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{exp}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z/F , CL/F).

Часть Б

Первичная конечная точка представляет собой:

• Частоту встречаемости и титры (если это применимо) ADA против FluAB_MLNS.

Вторичные конечные точки представляют собой:

• Безопасность и переносимость FluAB_MLNS, для измерения которых использовали частоту нежелательных явлений, связанных с лечением (TEAE), и клинические оценки.

• ФК-параметры FluAB_MLNS в сыворотке (например, C_{max} , C_{last} , T_{max} , T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{exp}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z/F , CL/F).

Часть В

Первичные конечные точки представляют собой:

• Безопасность и переносимость FluAB_MLNS, для измерения которых использовали частоту нежелательных явлений, связанных с лечением (TEAE), и клинические оценки.

• Эффективность: доля субъектов с подтвержденным в лабораторных условиях (с помощью ОТ-ПЦР) заболеванием гриппом А, которых определяли как имеющих ≥ 1 респираторного симптома и ≥ 1 системного симптома.

Вторичные конечные точки представляют собой:

• Долю субъектов с подтвержденным с использованием (вирусной) культуры заболеванием гриппом А.

• Серьезность и продолжительность сообщенных субъектом признаков и симптомов ILI в результате заболевания гриппом А.

• Количественную оценку вирусной нагрузки, присутствующей в назофарингеальных секретах во время первоначального проявления симптомов с помощью ОТ-кПЦР и вирусной культуры.

• ФК-параметры FluAB_MLNS в сыворотке.

• Частоту встречаемости и титры (если это применимо) ADA против FluAB_MLNS.

Конечные точки исследования могут включать:

• Воздействие FluAB_MLNS на потенциальных биомаркеров ответа хозяина после проявления ILI.

• Возникновение резистентности вируса к FluAB_MLNS у субъектов, у которой проявляется заболевание гриппом А.

• Полиморфизмы FcR, определенные с помощью генотипирования и потенциальных взаимодействий с механизмами действия FluAB_MLNS и/или по ФК.

• Аллотипы IgG1, определенные с помощью генотипирования.

• Частоту посещений медицинских учреждений с медицинским обслуживанием в течение периода мониторинга ILI.

• Измерение показателя снижения производительности труда и активности (WPAI) в связи с заболеванием гриппом А.

Перечень сокращений и определений, используемых в рассматриваемом примере

	ADA – антитело к лекарственному препарату
	ADE - антителозависимое усиление
5	AE – нежелательное явление
	ALT - аланинаминотрансфераза
	ALP – щелочная фосфатаза
	AST - аспартатаминотрансфераза
	AUC – площадь под кривой
10	BLQ – ниже предела количественной оценки
	BMI – индекс массы тела
	BUN – азот мочевины крови
	CLcr – клиренс креатинина
	CMC – химия, производство и контроль
15	CTCAE – общие терминологические критерии нежелательных явлений
	DMC – комитет по мониторингу данных
	ЕС – комитет по этике
	ЭКГ - электрокардиограмма
	eCRF – электронная форма отчета о клиническом случае
20	EOS – окончание исследования
	ET – досрочное завершение
	FcR – Fc-рецепторы для IgG
	FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых
	продуктов и медикаментов
25	GCP – надлежащая практика проведения клинических испытаний
	GGT - гаммаглутамилтрансфераза
	GLP – надлежащая лабораторная практика
	GMP – надлежащая производственная практика
	HA - гемагглютинин
30	HED – эквивалентная доза для человека
	Hgb - гемоглобин
	ICF – форма информированного согласия
	ICH – международная конференция по гармонизации

	IgG - иммуноглобулин G
	ILI – гриппоподобное заболевание
	IM - внутримышечно
	IND – новый исследуемый препарат
5	INR – международное нормализованное отношение
	IP – исследуемый продукт
	IRB – совет по институциональному обзору
	IV - внутривенно
	IWRS – интерактивная система с доступом через интернет
10	LDH - лактатдегидрогеназа
	LLN – нижний предел нормального диапазона
	LLOQ – нижний предел количественной оценки
	LLT – термин низкого уровня
	MAт - моноклональное антитело
15	MedDRA – медицинский словарь для регуляторной деятельности
	NOAEL – уровень, не вызывающий видимых нежелательных явлений
	OTC – безрецептурный препарат
	PK - фармакокинетика
	POC – проверка концепции
20	RBC - эритроцит
	SAD – однократная возрастающая доза
	SAE – серьезное неблагоприятное явление
	SD – стандартное отклонение
	SOC – класс системы органов
25	SRC – комитет по рассмотрению безопасности
	SUSAR – предполагаемая непредвиденная нежелательная реакция
	ULN – верхний предел нормального диапазона
	WBC - лейкоцит
	WHO – всемирная организация здравоохранения
30	WOCBP – женщина с детородным потенциалом
	WPAI – снижение производительности труда и активности

Пример 8: Связывание с человеческим FcRn при различных pH

С помощью бислойной интерферометрии (BLI) проводили параллельное сравнение способности FluAB_wt и FluAB_MLNS к связыванию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Для этой цели связывание FluAB_wt и FluAB_MLNS с

5 человеческим FcRn измеряли с помощью устройства Octet RED96 (бислойная интерферометрия BLI, фирма ForteBio). Биосенсоры, сенсibilизированные антителом к человеческому Fab-CH1, предварительно гидрировали в кинетическом буфере в течение 10 мин при КТ. Затем человеческое МАт (FluAB_wt или FluAB_MLNS) наносили на биосенсоры в концентрации 1 мкг/мл

10 в кинетическом буфере при pH 7,4 в течение 30 мин. Исходный уровень измеряли в кинетическом буфере (стерильный профильтрованный 0,01% свободный от эндотоксинов бычий сывороточный альбумин, 0,002% Твин-20 (Полисорбат 20), 0,005% NaN₃ в 3ФР) при pH=7,4 или pH=6, в течение 4 мин. Затем загруженные человеческим Ат сенсоры в течение 7 мин подвергали

15 воздействию раствора человеческого FcRn в концентрации 1 мкг/мл в кинетическом буфере при pH=7,4 или pH=6,0 для измерения ассоциации FcRn–МАт в различном окружении (скорость реакции ассоциации). Затем определяли диссоциацию в кинетическом буфере при таком же значении pH в течение еще 5 мин (скорость реакции диссоциации). Все стадии осуществляли при

20 перемешивании при 1000 об/мин при 30°C. Профили ассоциации и диссоциации определяли в реальном времени по изменению картин интерференции.

Как продемонстрировано на фиг. 38А и 38Б, FluAB_MLNS связывалось с человеческим FcRn с более высокой аффинностью по сравнению с FluAB_wt при кислом pH (pH 6,0), в то время как ни FluAB_MLNS, ни FluAB_wt не

25 связывались с FcRn при нейтральном pH (pH 7,4).

Пример 9: Характеризация полиморфизмов, идентифицированных в удлинённом эпитопе антитела

Исторические полиморфизмы в удлинённом эпитопе изучали в отношении их воздействия на нейтрализующую активность FluAB_MLNS с использованием

30 вирусов, созданных с помощью методов обратной генетики с использованием H1 НА или H3 НА с (генетическим) фоном A/Puerto Rico/8/34 (PR8).

Однонуклеотидные полиморфизмы интродуцировали в плазмиды PR8 H1 НА или A/Aichi/2/68 (Aichi) НА pHW2000 с помощью сайтнаправленного

мутагенеза. Сохраняли рекомбинантный вирус influenza A в ассоциации с H1 или H3 HA на PR8-фоне с использованием стандартных методов (например, описанных у Erich Hoffmann, Gabriele Neumann, Yoshihiro Kawaoka, Gerd Hobom, Robert G. Webster, A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (11), май 200 г., сс. 6108-6113; doi: 10.1073/pnas.100133697).

Нейтрализующую активность оценивали на MDCK-клетках с использованием стандартных методов. Например, нейтрализующую активность можно оценивать на MDCK-клетках, например, в 96-луночных планшетах. Для этой цели MDCK-клетки можно высевать из расчета 30000 клеток/лунку за 24 ч до заражения. Антитело FluAB_MLNS можно инкубировать с вирусом в течение 1 ч при 37°C перед добавлением к MDCK-клеткам. Для этого можно создавать 9 серийных разведений в соотношении 1:2,5 FluAB_MLNS в среде для заражения и каждое разведение можно тестировать в трех повторностях (например, 50 мкг/мл – конечная концентрация 0,03 мкг/мл) и можно инкубировать с 120 TCID₅₀ вируса в течение 1 ч при 37°C. MDCK-клетки можно промывать дважды с помощью ЗФР, можно добавлять 100 мкл/лунку раствора вирус:антитело и клетки можно инкубировать в течение 4 ч при 37°C. Через 4 ч к клеткам можно добавлять 100 мкл/лунку среды для заражения. После инкубации в течение 72 ч при 37°C, вирусную РНК можно экстрагировать и измерять с помощью qOT-ПЦР, например, используя WHO-праймеры (World Health Organization. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A H1N1. 28 апреля 2009 г.). Величина IC₅₀ представляет собой концентрацию антитела в мкг/мл, при которой репликация вирусов снижается на 50%, и ее можно рассчитывать с помощью аппроксимации данных, стандартизованных относительно результатов, полученных в контрольных лунках (не содержащих вирус и содержащих только вирус), нелинейной 4-параметрической логистической кривой.

Данные о нейтрализующей активности FluAB_MLNS в отношении полиморфизмов H1 и H3 HA в удлиненном эпитопе представлены ниже в таблице

4.

Таблица 4

Вирус	Аминокислотные изменения в HA	FluAB_MLNS	
		Геометрическое среднее характеризующей нейтрализацию величины IC ₅₀ (мкг/мл)	Кратность изменения относительно WT-вируса
PR8:Aichi HA wt	дикий тип	5,6	NA
PR8:Aichi HA P11S	P11S	9,5	1,7
PR8:Aichi HA D46N	D46N	3,3	0,6
PR8:Aichi HA N49T	N49T	5,0	0,9
PR8 wt	дикий тип	4,7	NA
PR8 HA N146D	N146D	5,5	1,2

Aichi обозначает A/Aichi/2/68; геометрическое среднее обозначает геометрическое среднее значение; HA обозначает гемагглютинин; NA обозначает непригодно; PR8 обозначает A/Puerto Rico/8/34 H1N1; wt обозначает дикий тип

5

Касательно вирусов, кодирующих HA H3, установлено, что антитело FluAB_MLNS нейтрализовало вирусы с мутациями HA1 P11S, HA2 D46N или HA2 N49T, что характеризовалось величинами IC₅₀, сходными с аналогичными величинами для вируса дикого типа (изменение IC₅₀ < 2-кратного относительно вируса дикого типа). Касательно вирусов, кодирующих HA H1, установлено, что FluAB_MLNS нейтрализовало вирусы, кодирующие HA2 N146D, что характеризовалось величинами IC₅₀, сходными с аналогичными величинами для вируса дикого типа (изменение IC₅₀ < 2-кратного относительно вируса дикого типа). Кроме того, применяемый штамм дикого типа PR8 кодировал полиморфизмы L38Q и D46N HA2 и его нейтрализация антителом FluAB_MLNS характеризовалось величиной IC₅₀, составляющей 4,7 мкг/мл. В целом установлено, что в случае FluAB_MLNS все изученные полиморфизмы приводили к кратности изменения IC₅₀ < 2 по сравнению с вирусом дикого типа. Таким образом, установлено, что FluAB_MLNS эффективно нейтрализовало все изученные исторические полиморфизмы в удлиненном эпитопе (H3 HA: HA1 P11S, HA2 D46N или HA2 N49T; H1 HA: N146D).

15

20

Пример 10: Ответ в виде антитела к лекарственному препарату у Tg32-мышей

25

Касательно мутации M428L/N434S в настоящее время считается, что эта мутация повышает иммуногенность антител, которые содержат указанную мутацию (Brian C. Mackness, Julie A. Jaworski, Ekaterina Boudanova, Anna Park, Delphine Valente, Christine Mauriac, Olivier Pasquier, Thorsten Schmidt, Mostafa

Kabiri, Abdullah Kandira, Katarina Radošević и Huawei Qiu. Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life, mAbs, 11:7, 2019, cc. 1276-1288; Maeda A., Iwayanagi Y., Haraya K. и др. Identification of human IgG1 variant with enhanced FcRn binding and without increased binding to rheumatoid factor autoantibody. MAbs 9(5), 2017, cc. 844–853).

Для оценки иммуногенности, в частности ответа против лекарственного препарата (антитела к лекарственному препарату; ADA), антитела FluAB_MLNS в сравнении с родительским антителом FluAB_wt, двум различным группам (n=5) TG32-мышей (мыши, трансгенные по человеческому FcRn) инъецировали i.v. моноклональные антитела либо FluAB-MLNS, либо FluAB_wt в дозе 5 мг/кг. Затем для оценки циркулирующих уровней инъецированных МАт получали образцы крови в различные моменты времени. Образцы, собранные в дни 14 и 21 после инъекции, использовали для оценки с помощью специфического ELISA ответа в виде антител к лекарственному препарату (ADA), вызываемого инъецированными человеческими моноклональными антителами.

В целом, метод состоял в следующем: очищенными моноклональными антителами FluAB_wt и FluAB_MLNS в концентрации 2 мкг/мл сенсibilizировали 96-луночные планшеты. После блокады сыворотку из обработанных животных, полученную через 14 дней и 21 день после инъекции, разведенную в соотношении 1: 180, инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре (КТ). После промывок в планшеты добавляли меченный пероксидазой F(ab')₂-фрагмент козьего антимышиного IgG (0,16 мкг/мл) и инкубировали в течение 1,5 ч при КТ. Затем выявляли ADA IgG (мышиние антитела против инъецированных антител FluAB_wt и FluAB_MLNS) с использованием соответствующего субстрата и результаты считывали с помощью спектрофотометра. Данные представлены в виде значений ОП (450 нм), полученных в каждом индивидуальном образце сыворотки (n=5/группу), собранном через 14 дней и 21 день после i.v.-введения антитела. Сыворотку из наивных Tg32-мышей (ctrl) применяли в качестве отрицательного контроля.

Результаты представлены на фиг. 39А и 39Б. При создании изобретения неожиданно было установлено, что сигнал, соответствующий мышинному сывороточному IgG, дающему реакцию с антителом FluAB-MLNS, оказался очень низким и соответствовал сигналу, обнаруженному в контроле, т.е. у не

подвергнутых инъекции животных, в то время как в отличие от этого ADA-ответ в сыворотке мышей, которым инъецировали FluAB_wt, оказался весьма высоким как через 14 дней, так и через 21 день после i.v.-инъекции (фиг. 39А). Кроме того, уровни ADA, установленные в день 14 после инъекции, существенно и
5 обратно коррелировали с уровнями циркулирующего FluAB_wt (уровни FluAB_wt в сыворотке снижались из-за присутствия мышинных антител против FluAB_wt), в то время как уровни циркулирующего FluAB-MLNS, определенные в это же время, были фактически существенно более высокими и гомогенными (фиг. 39Б).

10 Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что ответ против лекарственного препарата (антитела к лекарственному препарату; ADA), и, как следствие иммуногенность FluAB_MLNS, снижались по сравнению с FluAB_wt, что было неожиданным.

Пример 11: Ответ в виде антител к лекарственному препарату и
15 иммуногенность после s.c.-введения

Для дополнительного подтверждения указанных неожиданных результатов в форматах, вызывающих большую иммуногенность, различным группам TG32-мышей (n=5) инъецировали либо FluAB-MLNS, либо FluAB_wt (5 мг/кг) подкожно (s.c.), что обычно рассматривается как более иммуногенный путь
20 введения. Через 3 недели после s.c.-введения измеряли уровни антител к лекарственному препарату в сыворотке с помощью специфического для оценки мышинных антител к лекарственным препаратам ELISA (согласно методу, описанному в примере 10) в сыворотке мышей, которым инъецировали s.c. либо FluAB_wt, либо FluAB_MLNS. В качестве отрицательного контроля
25 использовали пул сыворотки из 10 наивных необработанных животных.

Результаты представлены на фиг. 40. Несмотря на более иммуногенный формат опытов, у животных, обработанных s.c. FluAB-MLNS, все еще не возникал гуморальный иммуногенный ответ, что подтверждено на основе титра анти-hIgG антител в сыворотке, перекрывающего титр, обнаруженный в
30 сыворотке не подвергнутых инъекции контрольных животных. И, наоборот, титр ADA у животных, обработанных FluAB_wt, оказался четко позитивным и поддавался измерению у всех обработанных животных. Подтверждена обратная корреляция между циркулирующими уровнями инъецированного антитела и

эндогенным анти-hIgG-ответом в сыворотке мышей, которым инъецировали только FluAB_wt (данные не представлены).

Указанные результаты являются неожиданными и демонстрируют, что антитело FluAB_MLNS обладает меньшей иммуногенностью по сравнению с его родительским антителом FluAB_wt.

Пример 12: Нейтрализующая активность *in vitro*

Способность FluAB_WT к нейтрализации широкого спектра вируса гриппа А оценивали *in vitro* в двух различных исследованиях с использованием анализа микронеutralизации. Изучали панель, включающую 52 изолята вируса гриппа А, собранных в 1933-2014 г.г., из которых 24 изолята отнесены к группе 1 вирусов (подтипы H1, H2, H5, H6, and H9) и 28 к группе 2 вирусов (подтипы H3 и H7). В одном исследовании установлено, что FluAB_WT нейтрализовали все 37 вирусов, что характеризовалось медианной ингибирующей концентрацией (при которой ингибирующее действие составляло половину от максимального) IC_{50} 0,78 мкг/мл (диапазон от 0,12 до 3,07 мкг/мл). В другом исследовании установлено, что FluAB_WT нейтрализовало 15 дополнительных вирусных штаммов, выделенных в 2010-2014 г.г., что характеризовалось медианной величиной IC_{50} 0,199 мкг/мл (диапазон от 0,067 до 2,69 мкг/мл). Медианная величина IC_{50} для всех вирусов группы 1 и группы 2 в обоих исследованиях, кроме двух 7:1 рекомбинантных вирусов PR8, составляла 0,1 мкг/мл для вирусов группы 1 и 0,80 мкг/мл для вирусов группы 2 (n=24 и n=26 соответственно). В целом, для 17 протестированных H1N1-вирусов определены медианные величины IC_{50} 0,28 мкг/мл и IC_{90} 2,17 мкг/мл. Таким образом, можно считать установленным, что FluAB_WT обладает стойкой нейтрализующей активностью, несмотря на встречающийся в естественных условиях антигенный дрейф. Указанные данные подтвердили также стойкую нейтрализующую активность FluAB_MLNS.

Таблица последовательностей и номера SEC ID: (перечень последовательностей):

SEQ ID NO	Последовательность	Примечание
FluAB_MLNS		
SEQ ID NO: 1	SYNAVWN	CDRH1
SEQ ID NO: 2	RTYYRSGWYNDYAESVKS	CDRH2
SEQ ID NO: 3	SGHITVFGVNVDADFDM	CDRH3
SEQ ID NO: 4	RTSQSLSSYTH	CDRL1
SEQ ID NO: 5	AASSRGS	CDRL2
SEQ ID NO: 6	QQSRT	CDRL3
SEQ ID NO: 7	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS SYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSG WYNDYAESVKSRTINPDTSKNQFSLQLNS VTPEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDADFDM WGQGTMTVTVSS	VH
SEQ ID NO: 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSS YTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS RTFGQGTKVEIK	VL
SEQ ID NO: 9	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSS YNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGW YNDYAESVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDADFDMWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKITVDKSRWOOQGNVESCSVIHEALHSHY	Тяжелая цепь
SEQ ID NO: 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSS YTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSR TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь
FluAB_wt		

SEQ ID NO	Последовательность	Примечание
SEQ ID NO: 11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS SYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSG WYNDYAESVKSRTINPDTSKNQFSLQLNS VTPEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDAFDM WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV <u>M</u> HEAL H <u>N</u> HYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь

Все патенты США, публикации заявок на патент США, публикации патентов США, иностранные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании или в

5 присоединенном списке публикаций, включены в него в качестве ссылки в их полном объеме в той степени, в которой они не противоречат настоящему описанию.

Предварительная заявка на патент США 62/893747, зарегистрированная 29 августа 2019 г., предварительная заявка на патент США 62/993519,

10 зарегистрированная 23 марта, 2020 г., и предварительная заявка на патент 63/040966, зарегистрированная 18 июня 2020 г. в полном объеме включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Из вышеуказанного должно быть очевидно, что хотя с целью иллюстрации описаны конкретные варианты осуществления изобретения, можно осуществлять

15 различные модификации без отклонения от сущности и объема изобретения. Таким образом, изобретение ограничено только прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предупреждения заражения вирусом гриппа А субъекта, где способ включает введение субъекту однократной дозы
- 5 фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9.
- 10 2. Способ по п. 1, в котором фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации от 100 мг/мл до 200 мг/мл, например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.
- 15 3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором однократная доза содержит 3, 4, 5, 6 или 7, предпочтительно 5 мг антитела на кг веса тела субъекта.
4. Способ по одному из п.п. 1-3, в котором однократная доза содержит вплоть до 60 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 1200 мг, вплоть до 1800 мг или
- 20 вплоть до 3000 мг антитела.
5. Способ по одному из п.п. 1-4, в котором однократная доза содержит вплоть до 60 мг, вплоть до 70 мг, вплоть до 80 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 100 мг, вплоть до 200 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 400 мг, вплоть до 500 мг,
- 25 вплоть до 600 мг, вплоть до 700 мг, вплоть до 800 мг, вплоть до 900 мг, вплоть до 1000 мг, вплоть до 1100 мг, вплоть до 1200 мг, вплоть до 1300 мг, вплоть до 1400 мг, вплоть до 1500 мг, вплоть до 1600 мг, вплоть до 1700 мг, вплоть до 1800 мг, вплоть до 2000 мг, вплоть до 2500 мг или вплоть до 3000 мг антитела.
- 30 6. Способ по одному из п.п. 1-5, в котором антитело вводят в дозе 60 мг, 300 мг, 1200 мг или 1800 мг.

7. Способ по одному из п.п. 1-5, в котором антитело вводят в дозе 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1100 мг или 1200 мг.

8. Способ по одному из п.п. 1-7, в котором:

5 (I) однократная доза содержит 300 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде одной инъекции, содержащей 2 мл фармацевтической композиции;

10 (II) однократная доза содержит 1200 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде двух инъекций, каждая из которых содержит 4 мл композиции;

15 (III) однократная доза содержит 1800 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде трех инъекций, каждая из которых содержит 4 мл фармацевтической композиции; или

(IV) однократная доза содержит 60 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и дозу вводят в виде одной инъекции, содержащей 0,4 мл фармацевтической композиции.

20 9. Способ по одному из п.п. 1-8, в котором субъект представляет собой человека.

25 10. Способ по одному из п.п. 1-9, где способ включает внутримышечную (IM) инъекцию.

30 11. Способ по одному из п.п. 1-10, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду (например, воду для инъекций USP-класса или стерильную воду для инъекций US-класса).

12. Способ по одному из п.п. 1-11, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации

от 10мМ до 40мМ, предпочтительно 20мМ, в составе фармацевтической композиции.

13. Способ по одному из п.п. 1-12, в котором фармацевтическая
5 композиция дополнительно содержит сахар, такой как дисахарид, такой как сахароза, необязательно в диапазоне концентраций от 3,0% до 9,0% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 3,6% до 8,6%, более предпочтительно в диапазоне от 4% до 6%.

10 14. Способ по одному из п.п. 1-13, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество или трехблочный сополимер, необязательно полисорбат или полуксамер 188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), необязательно в диапазоне концентраций от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

15 15. Способ по одному из п.п. 1-14, в котором фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от 5,8 до 6,2, в диапазоне от 5,9 до 6,1 или рН 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

20 16. Способ по одному из п.п. 1-15, в котором однократная доза содержит от 0,8 мл до 4 мл на инъекцию.

17. Способ по п. 16, в котором однократная доза содержит или состоит из
0,8 мл, 0,9 мл, 1,0 мл, 1,1 мл, 1,2 мл, 1,3 мл, 1,4 мл, 1,5 мл, 1,6 мл, 1,7 мл, 1,8 мл,
25 1,9 мл, 2,0 мл, 2,1 мл, 2,2 мл, 2,3 мл, 2,4 мл, 2,5 мл, 2,6 мл, 2,7 мл, 2,8 мл, 2,9 мл, 3,0 мл, 3,1 мл, 3,2 мл, 3,3 мл, 3,4 мл, 3,5 мл, 3,6 мл, 3,7 мл, 3,8 мл, 3,9 мл или 4,0 мл композиции на инъекцию.

18. Способ по одному из п.п. 1-17, в котором примерно через 4 недели,
30 примерно через 12 недель и/или примерно через 20 недель после введения субъекту фармацевтической композиции субъект:

(I) имеет уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких респираторных симптомов, выбранных из: кашля, боли в горле, ринореи и заложенности носа или любой их комбинации, и/или

(II) имеет уменьшенное количество и/или серьезность одного или нескольких системных симптомов, выбранных из: лихорадки (температура в ротовой полости $>38^{\circ}\text{C}$ ($100,4^{\circ}\text{F}$); озноба; миалгии; головной боли; недомогания; усталости; или любой их комбинации

по сравнению с референс-субъектом в течение такого же периода времени, который получал плацебо или не получал лечение или вакцину против гриппа А.

19. Способ по одному из п.п. 1-18, в котором субъект имеет возраст от 18 до 65 лет и имеет индекс массы тела в диапазоне от 18 кг/м^2 до 32 кг/м^2 или в диапазоне от 18 кг/м^2 до 35 кг/м^2 .

20. Способ по одному из п.п. 1-19, включающий введение субъекту однократной дозы, содержащей фармацевтическую композицию, один раз в течение шестимесячного периода.

21. Способ по одному из п.п. 1-20, включающий введение субъекту однократной дозы, содержащей фармацевтическую композицию, один раз в течение двенадцатимесячного периода.

22. Способ по одному из п.п. 1-20, включающий введение субъекту однократной дозы, содержащей фармацевтическую композицию, дважды в течение шестимесячного периода, например один раз каждые три месяца.

23. Способ по одному из п.п. 1-22, включающий введение однократной дозы, включающей фармацевтическую композицию за 1-2 месяца (например, за 30-60 дней) до начала сезона гриппа или в первые 1-2 месяца сезона гриппа.

24. Способ по одному из п.п. 1-23, в котором антитело или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, ингибирует *in vitro*

инфекцию, вызываемую вирусом гриппа, что характеризуется величиной IC_{90} примерно 2,17 мкг/мл.

25. Способ по одному из п.п. 1-24, в котором:

- 5 (I) введенная фармацевтическая композиция содержит 60 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 1 мкг/мл до примерно 7 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения;
- (II) введенная фармацевтическая композиция содержит 300 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 8
- 10 мкг/мл до примерно 20 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения;
- (III) введенная фармацевтическая композиция содержит 1200 мг антитела и антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 50 мкг/мл до примерно 100 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения;
- (IV) введенная фармацевтическая композиция содержит 1800 мг антитела и
- 15 антитело присутствует в сыворотке субъекта в концентрации от примерно 70 мкг/мл до примерно 110 мкг/мл в течение вплоть до 120 дней после введения;
- и/или
- (V) антитело имеет период $t_{1/2}$ *in vivo* у субъекта, составляющий от 49 до 68
- дней.

- 20
26. Способ по одному из п.п. 1-25, в котором антитело в фармацевтической композиции имеет период $t_{1/2}$ *in vivo* у человека, составляющий от 49 до 68 дней, например, 49 дней, 50 дней, 51 день, 52 дня, 53 дня, 54 дня, 55 дней, 56 дней, 57 дней, 58 дней, 59 дней, 60 дней, 61 день, 62 дня, 63 дня, 64 дня, 65 дней, 66 дней,
- 25 67 дней или 68 дней.

27. Способ по одному из п.п. 1-26, в котором у субъекта не проявляется нежелательное явление (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений (СТСАЕ) необязательно вплоть до 140 дней после
- 30 введения однократной дозы фармацевтической композиции.

28. Способ по одному из п.п. 1-27, в котором у субъекта не проявляется умеренное нежелательное явление (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести

нежелательных явлений (СТСАЕ), необязательно вплоть до 140 дней после введения однократной дозы фармацевтической композиции.

29. Способ по одному из п.п. 1-28, в котором у субъекта не проявляется
5 серьезное нежелательное явление (АЕ) согласно Критериям оценки тяжести нежелательных явлений (СТСАЕ), необязательно вплоть до 140 дней после введения однократной дозы фармацевтической композиции.

30. Способ по одному из п.п. 1-29, в котором:

10 (I) однократная доза содержит 300 мг антитела, при этом фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза включает одну инъекцию, содержащую 2 мл фармацевтической композиции;

(II) однократная доза содержит 1200 мг антитела, при этом
15 фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза включает две инъекции, каждая из которых содержит 4 мл фармацевтической композиции;

(III) однократная доза содержит 1800 мг антитела, при этом
20 фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза включает три инъекции, каждая из которых содержит 4 мл фармацевтической композиции; или

(IV) однократная доза содержит 60 мг антитела, при этом
фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл и однократная доза содержит 0,4 мл композиции.

25 31. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, которое содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 9, где антитело присутствует в фармацевтической композиции в концентрации, находящейся в диапазоне от 100 мг/мл до 200
30 мг/мл, такой как 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду (например, воду для инъекций USP-класса или стерильную воду для инъекций US-класса).

5 33. Фармацевтическая композиция по п. 31 или п. 32, дополнительно содержащая гистидин, необязательно в концентрации от 10мМ до 40мМ, предпочтительно 20мМ, в составе композиции.

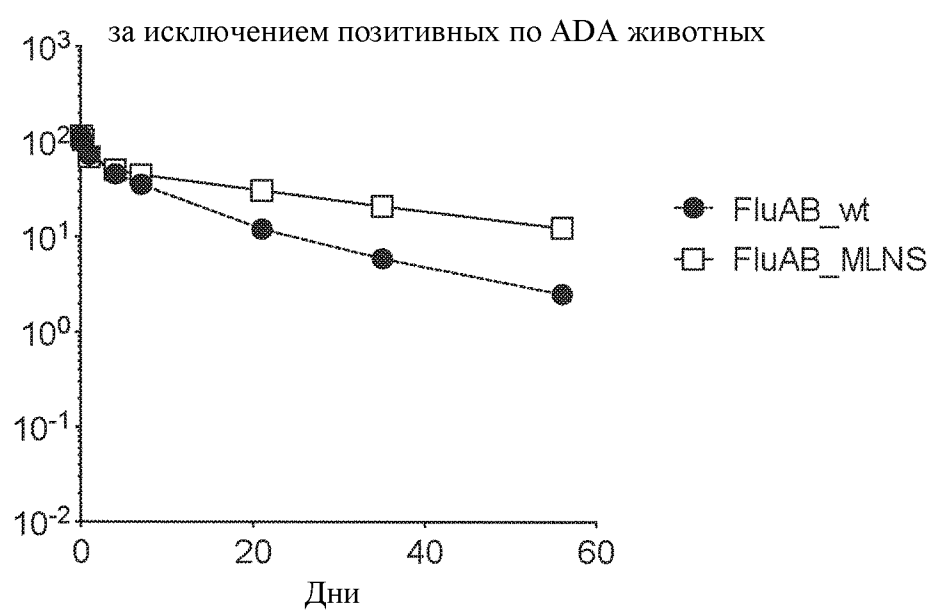
10 34. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 31-33, дополнительно содержащая сахар, такой как дисахарид, такой как сахароза, необязательно в диапазоне концентраций от 3,0% до 9,0% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 3,6% до 8,6%, более предпочтительно в диапазоне от 4% до 6%.

15 35. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 31-34, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество или трехблочный сополимер, необязательно полисорбат или полуксамер 188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), необязательно в диапазоне концентраций от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02%.

20 36. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 31-35, где композиция имеет рН в диапазоне от 5,5 до 6,5 или в диапазоне от 5,8 до 6,2, или рН 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5, предпочтительно 6,0.

25 37. Флакон, предпочтительно стеклянный, содержащий фармацевтическую композицию по одному из п.п. 31-36.

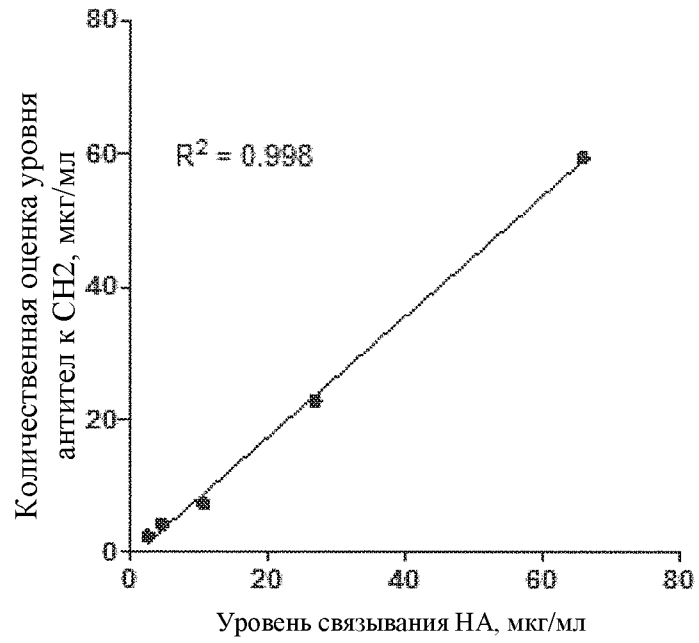
38. Шприц, содержащий фармацевтическую композицию по одному из п.п. 31-36.



Фиг. 1

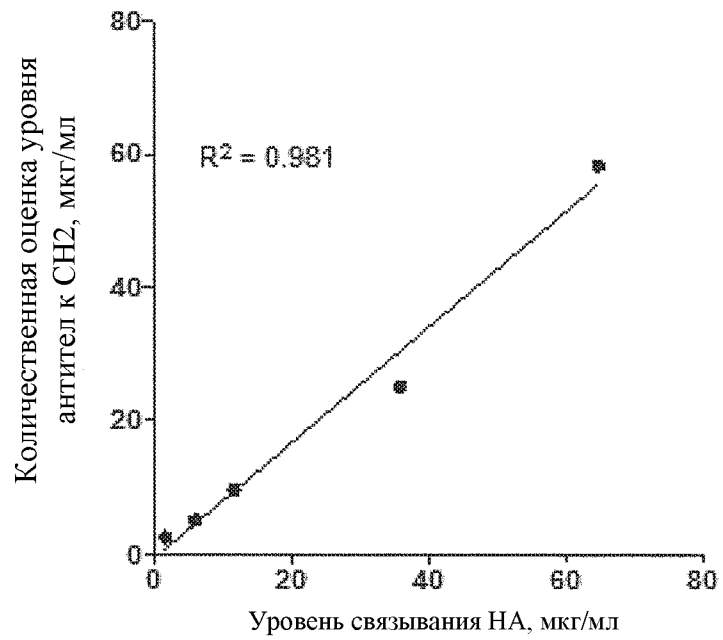
2/67

C90142

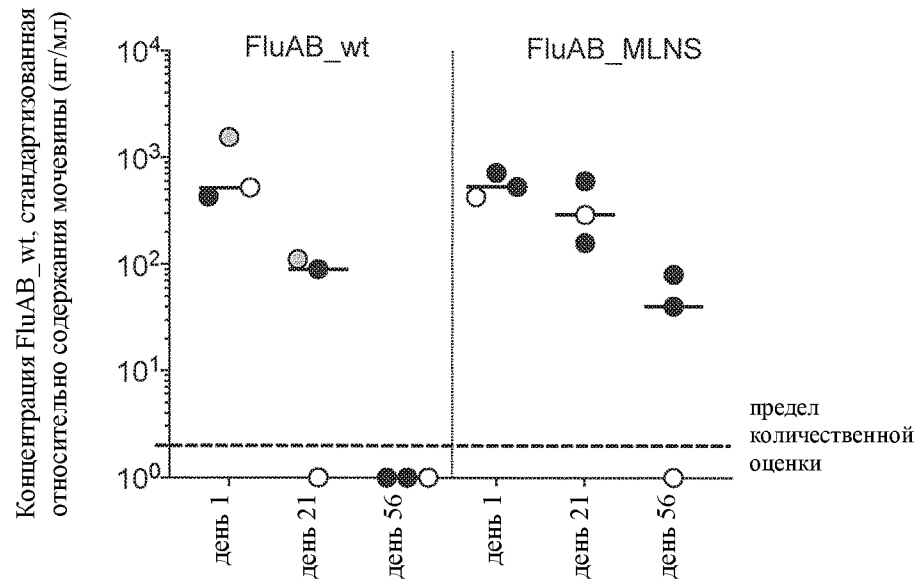


Фиг. 2А

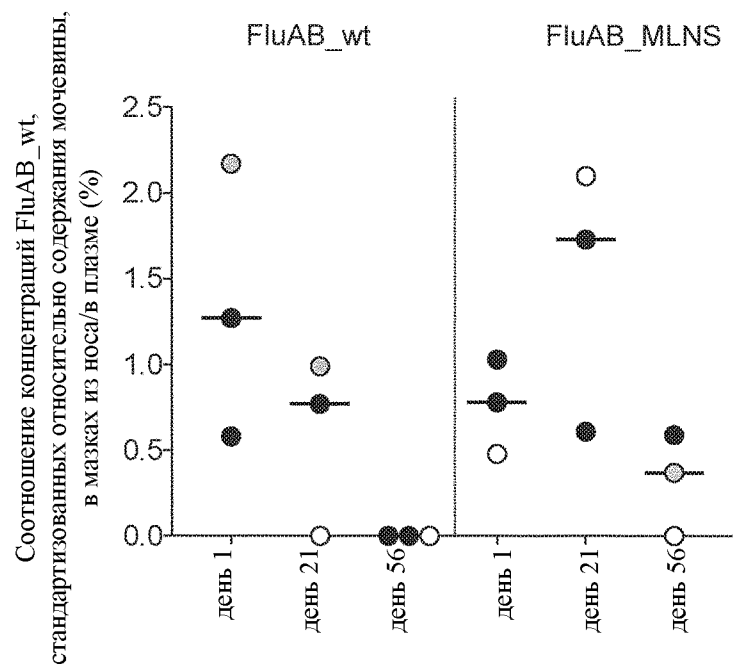
C90190



Фиг. 2Б

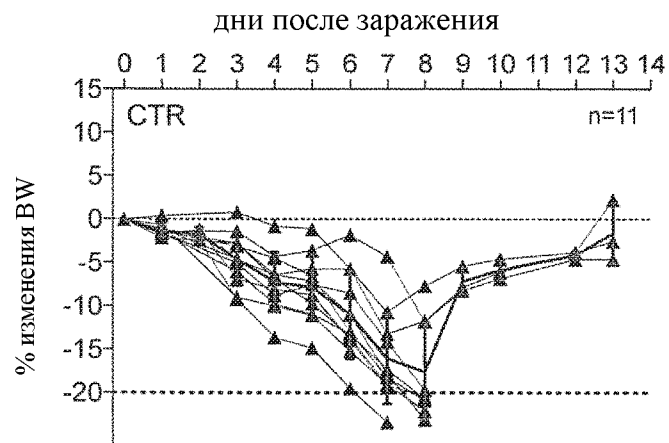


Фиг. 3А

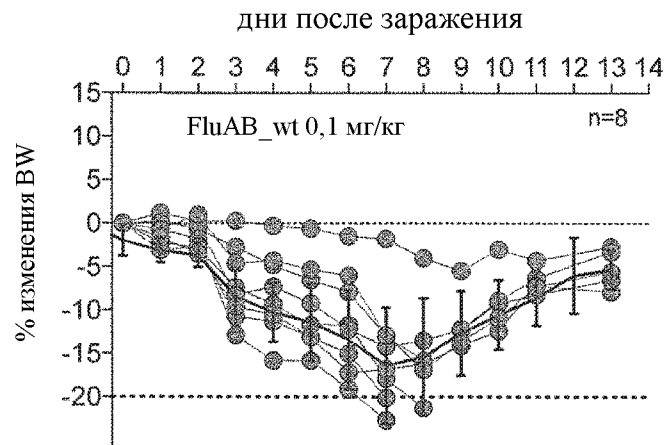


Фиг. 3Б

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ при сравнении с контролем
^o $p < 0,05$ ^{oo} $p < 0,01$ при сравнении с FluAB_wt

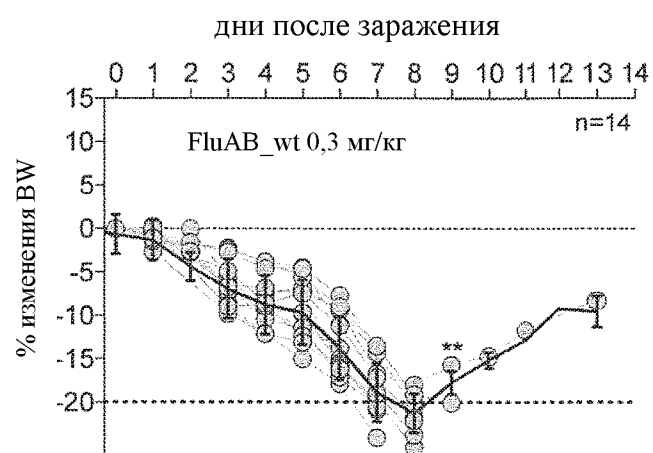


Фиг. 4А

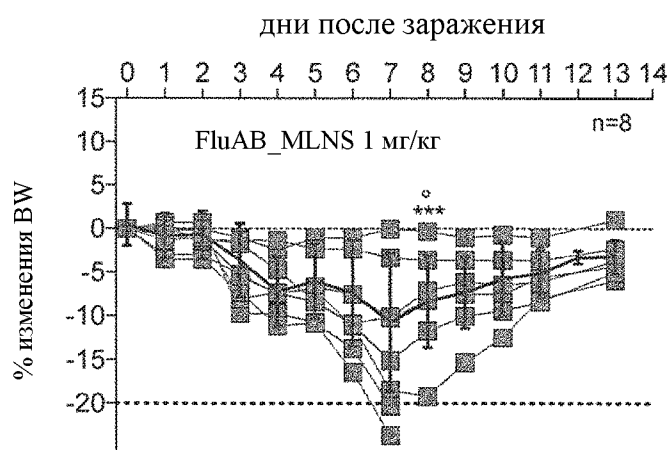


Фиг. 4Б

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ при сравнении с контролем
^o $p < 0,05$ ^{oo} $p < 0,01$ при сравнении с FluAB_wt

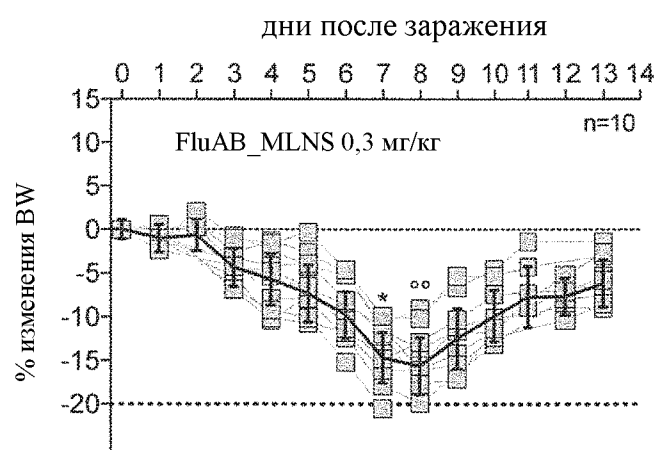


Фиг. 4В

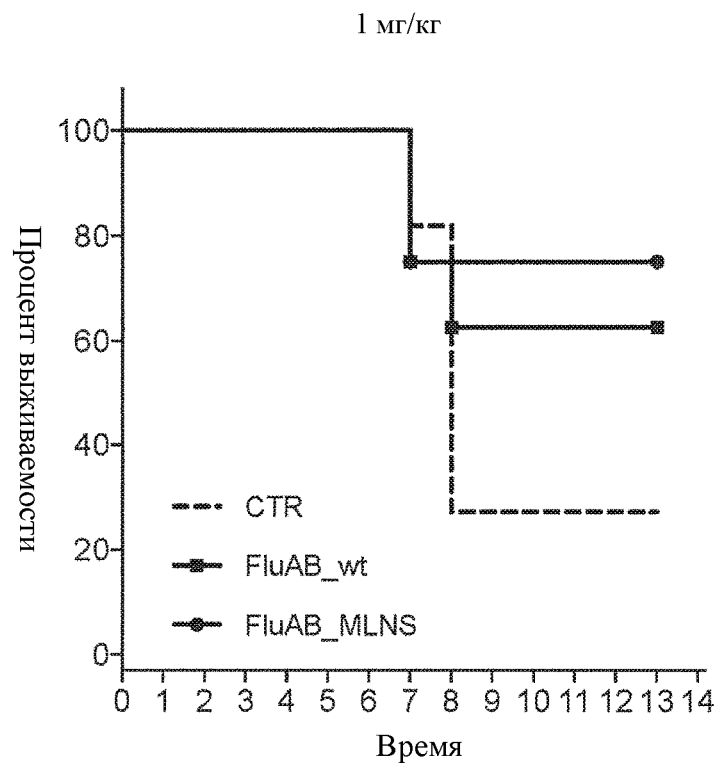


Фиг. 4Г

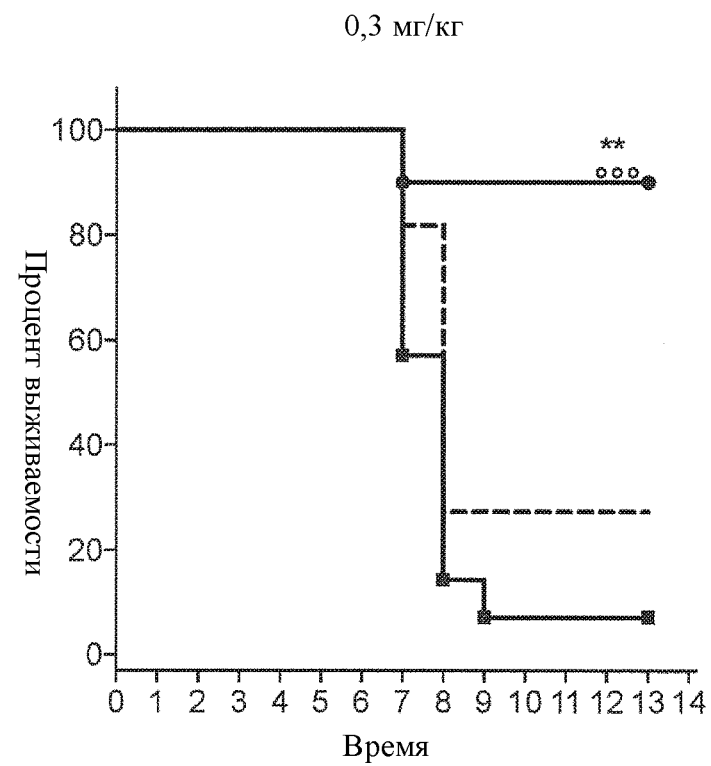
* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ при сравнении с контролем
° $p < 0,05$ °° $p < 0,01$ при сравнении с FluAB_wt



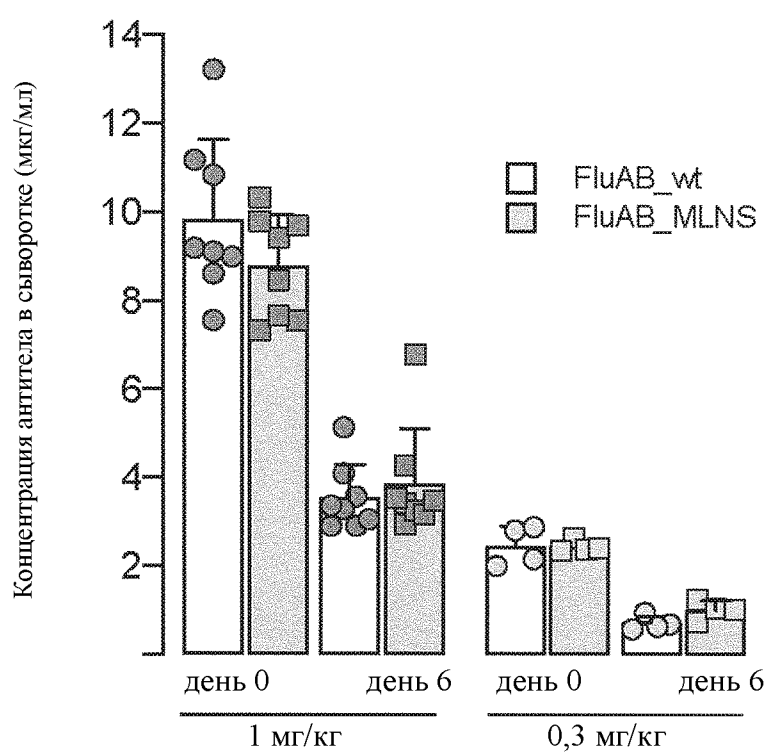
Фиг. 4Д



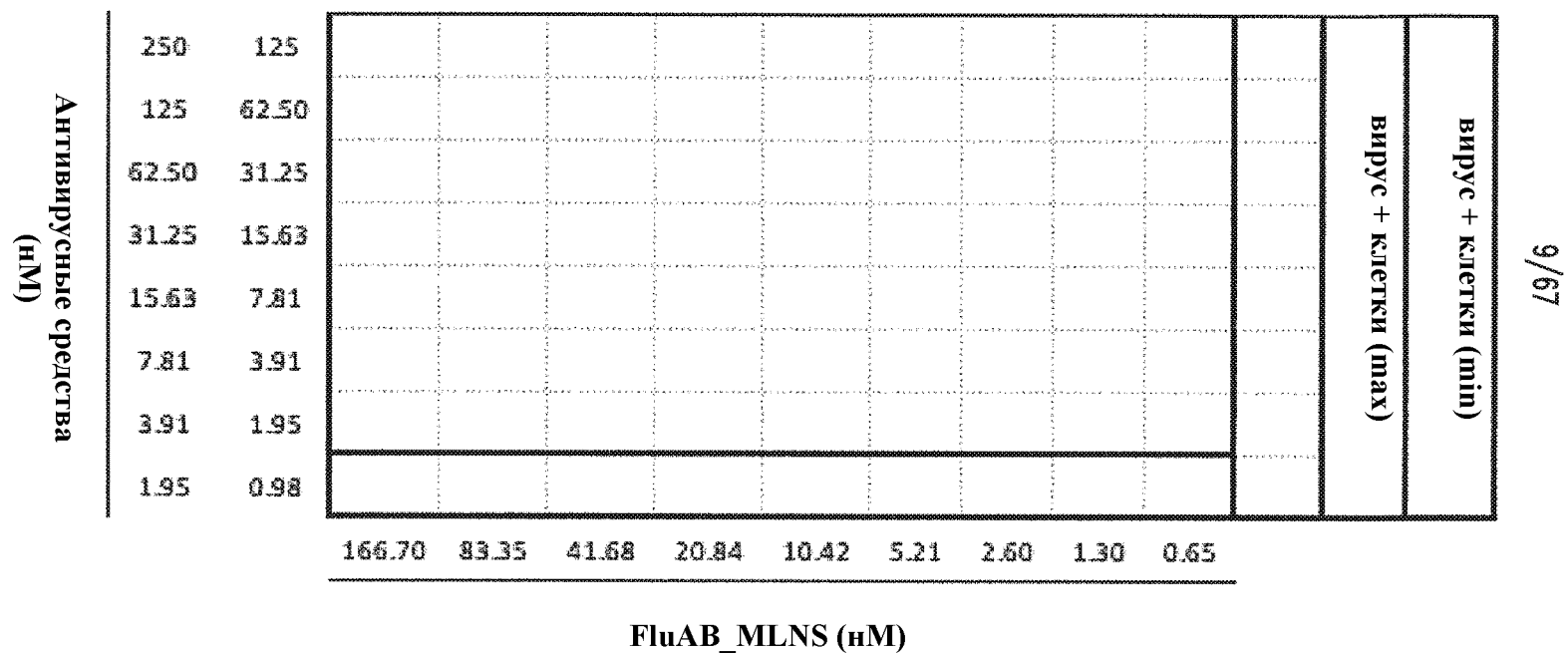
Фиг. 5А



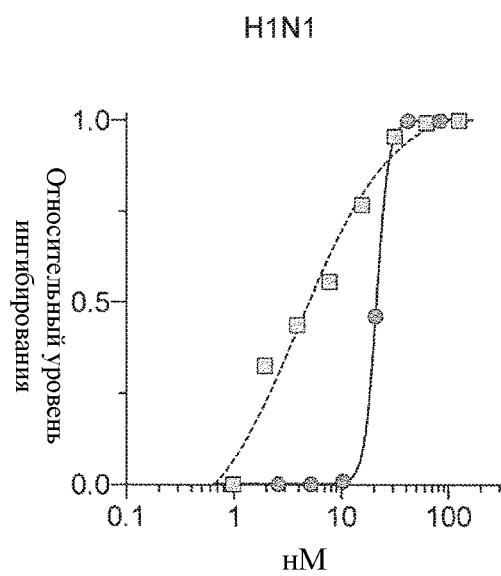
Фиг. 5Б



Фиг. 6

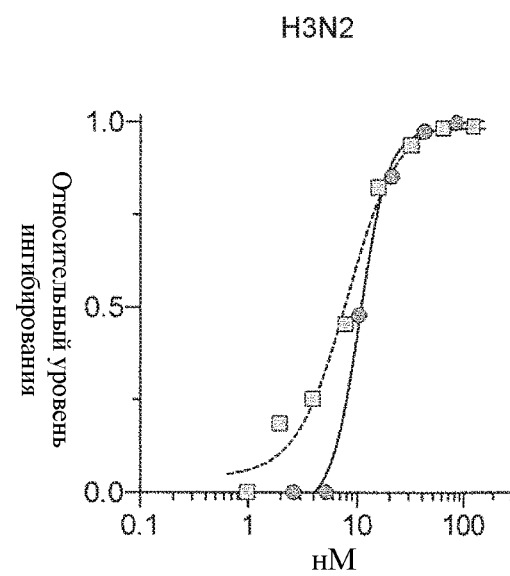


Фиг. 7

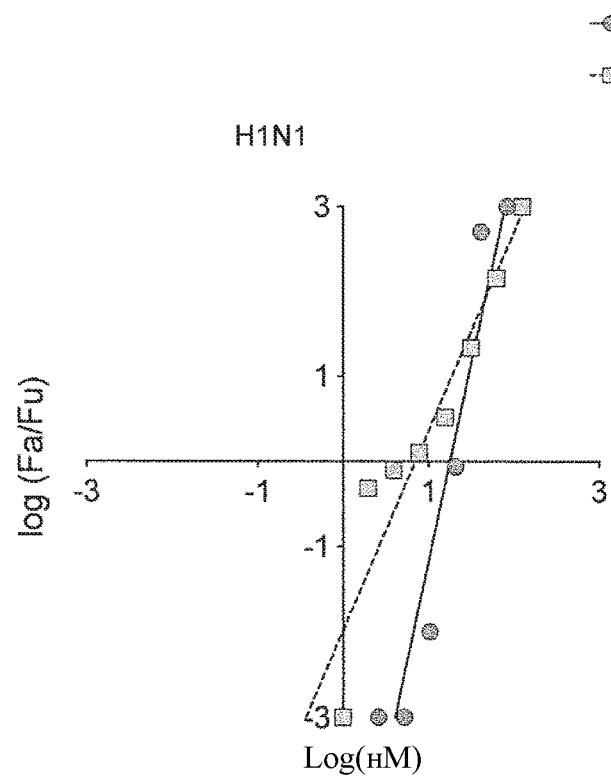


Фиг. 8А

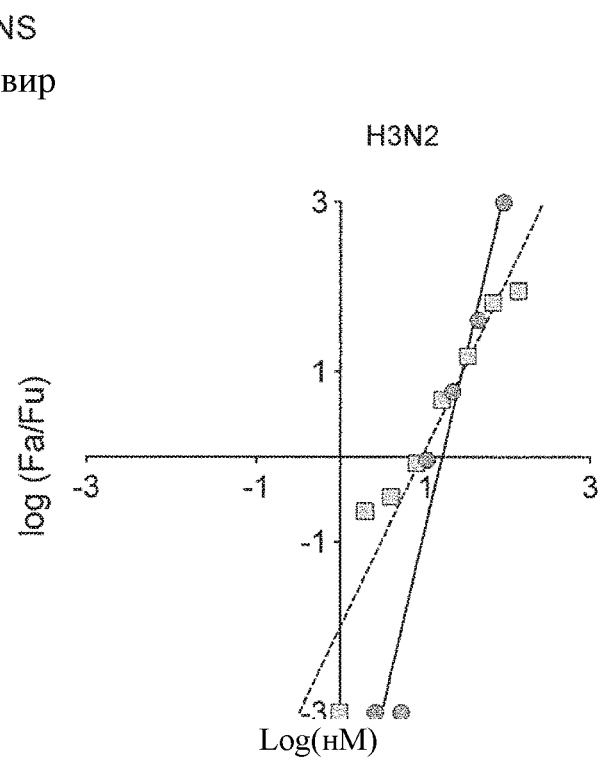
● FluAB MLNS
 ■ осельтамивир



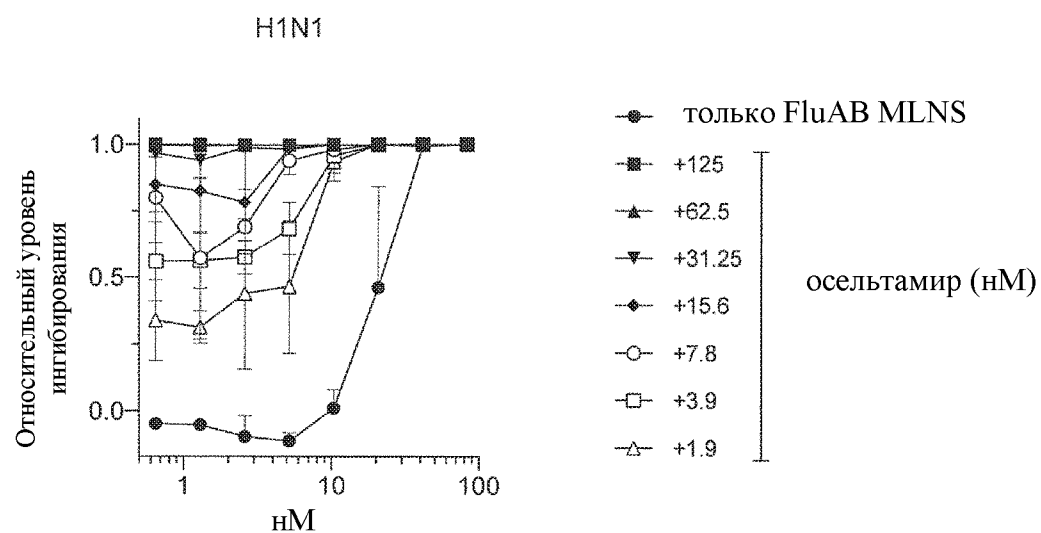
Фиг. 8Б



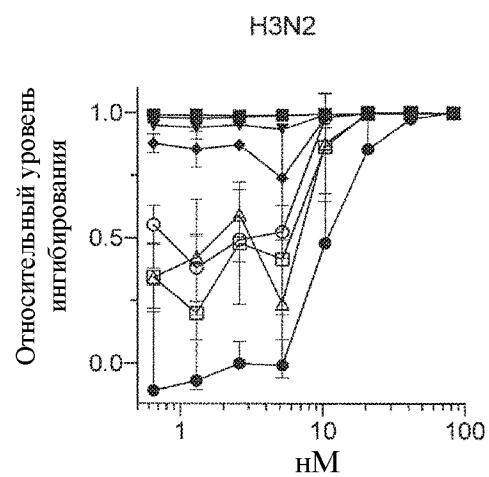
Фиг. 8В



Фиг. 8Г

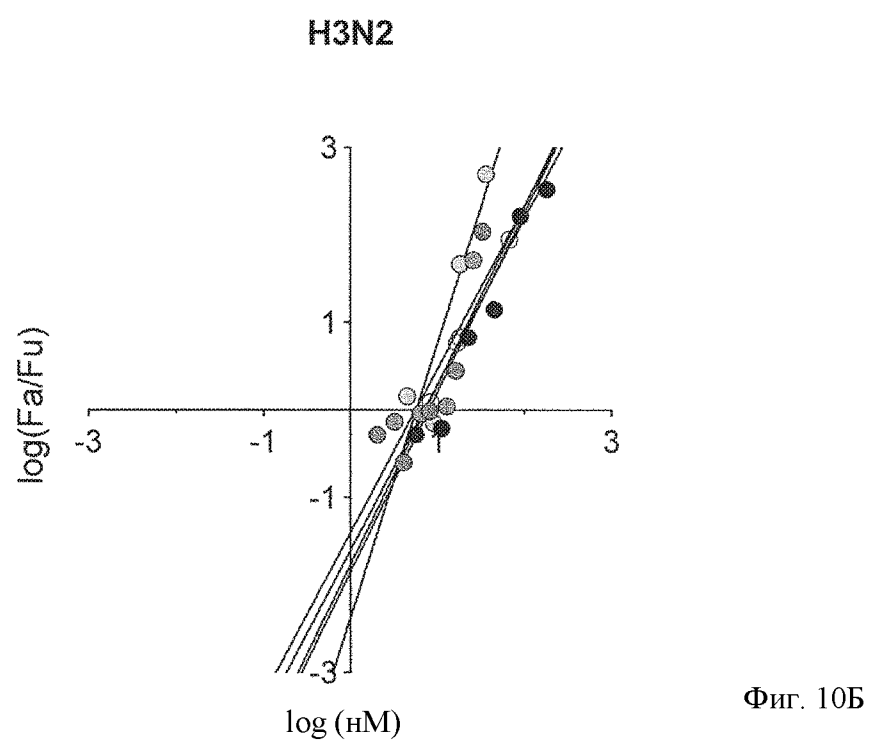
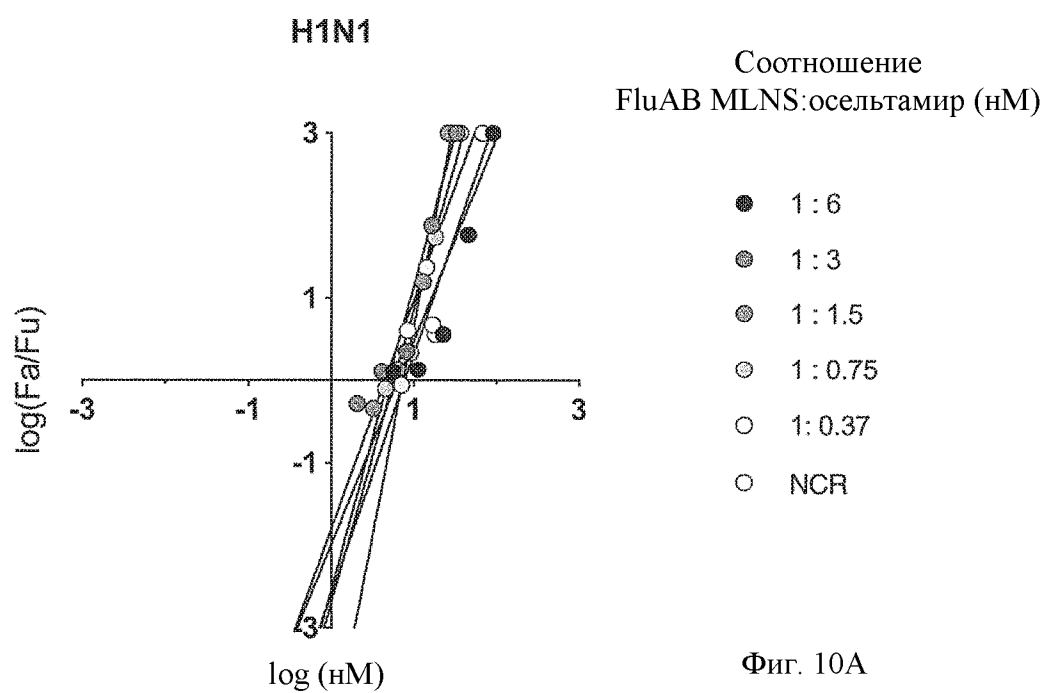


Фиг. 9А

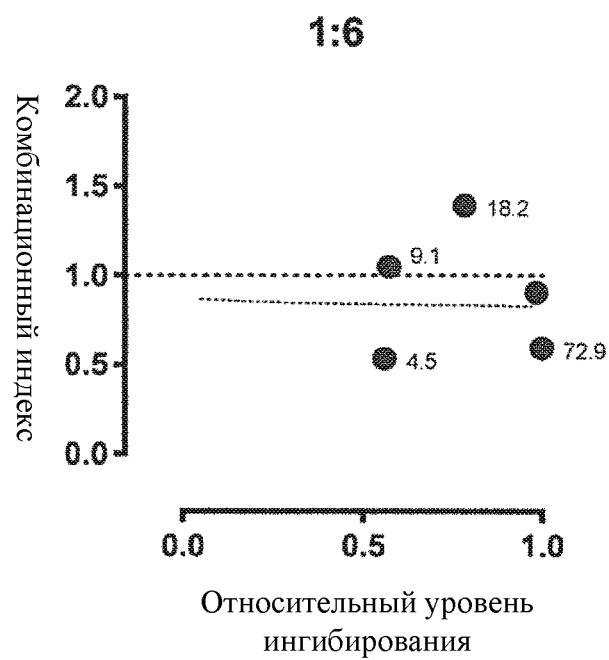


Фиг. 9Б

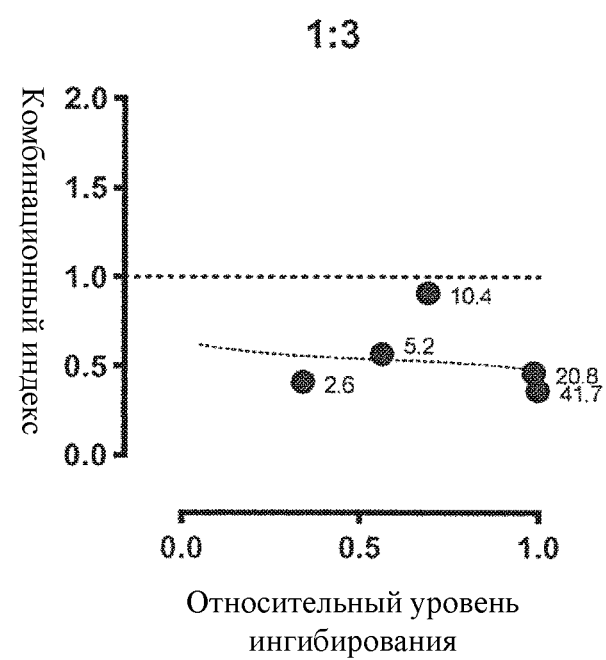
13/67



H1N1

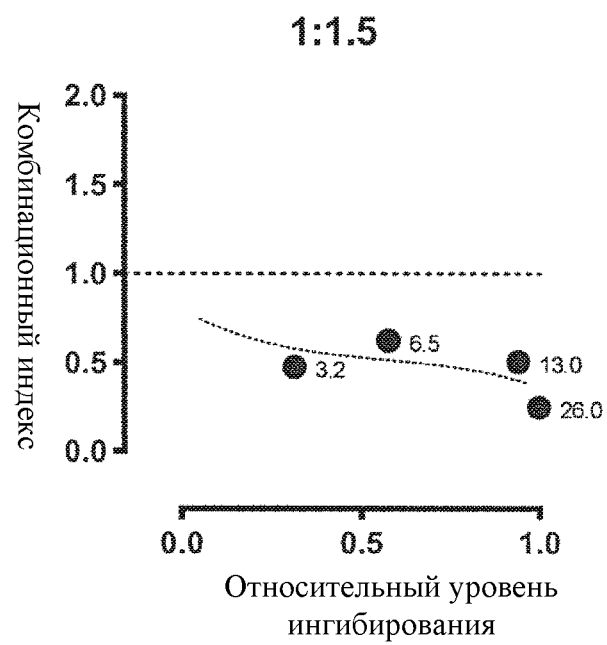


Фиг. 11А

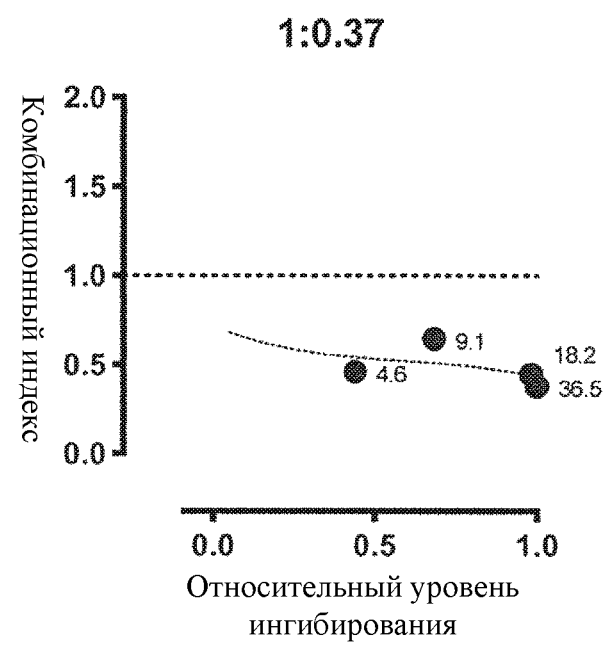


Фиг. 11Б

H1N1

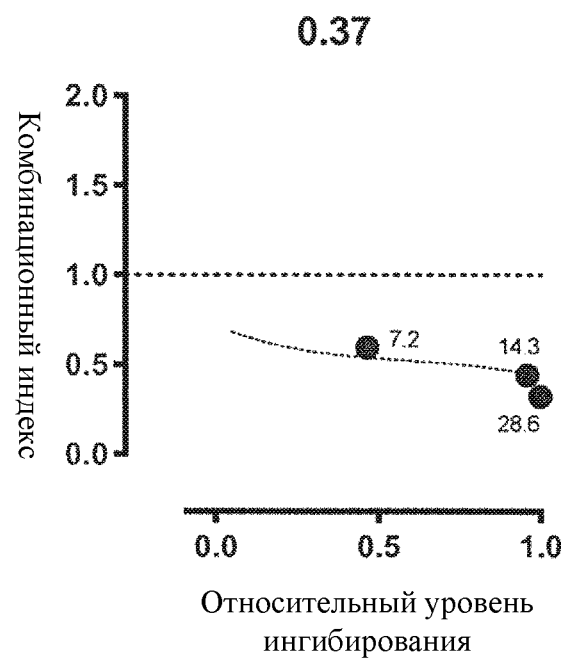


Фиг. 11В

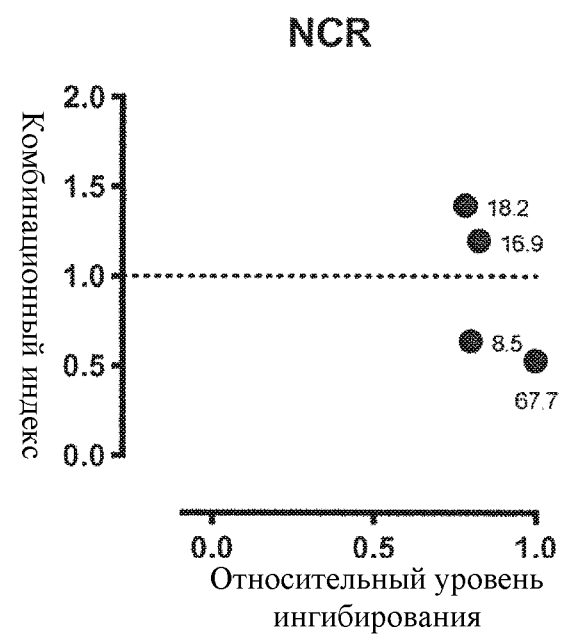


Фиг. 11Г

H1N1

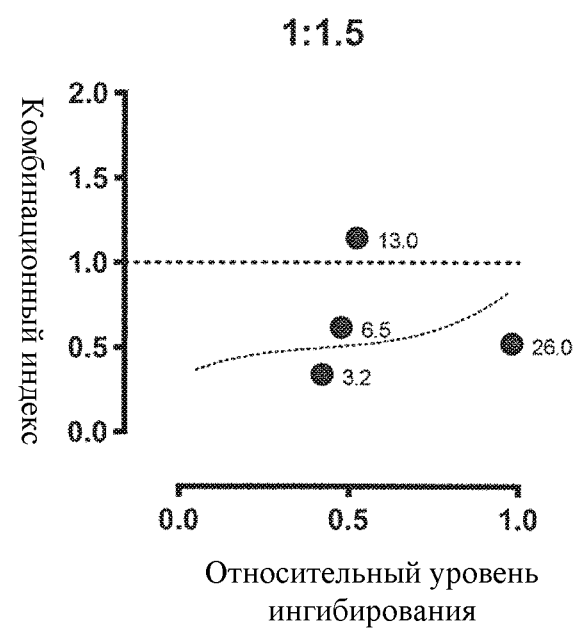
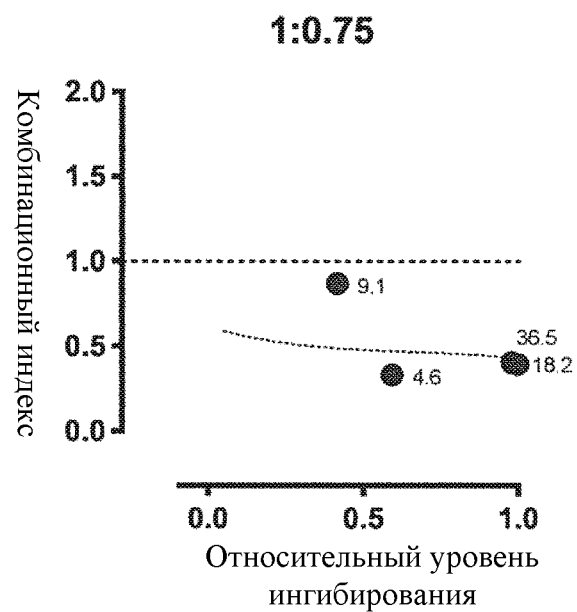


Фиг. 11Д



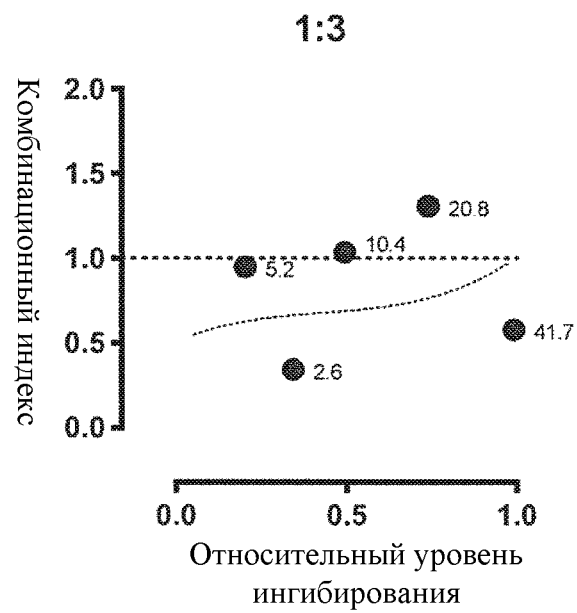
Фиг. 11Е

H3N2

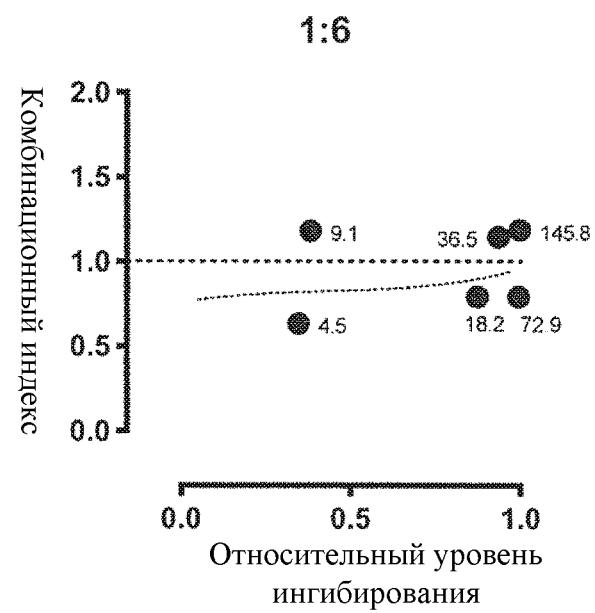


17/67

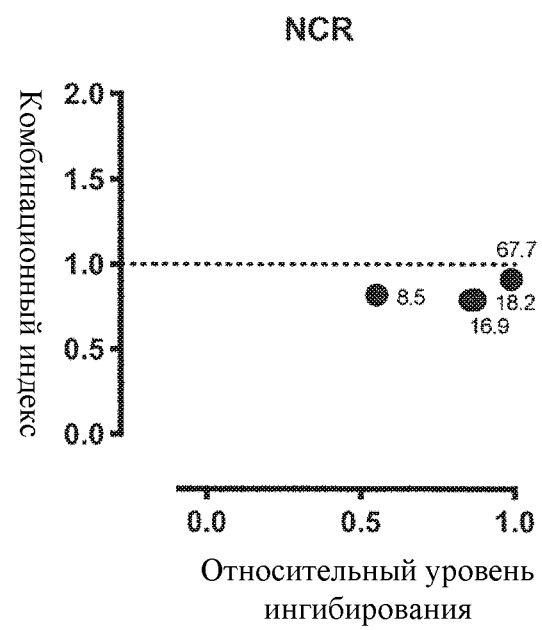
H3N2



Фиг. 12В



Фиг. 12Г

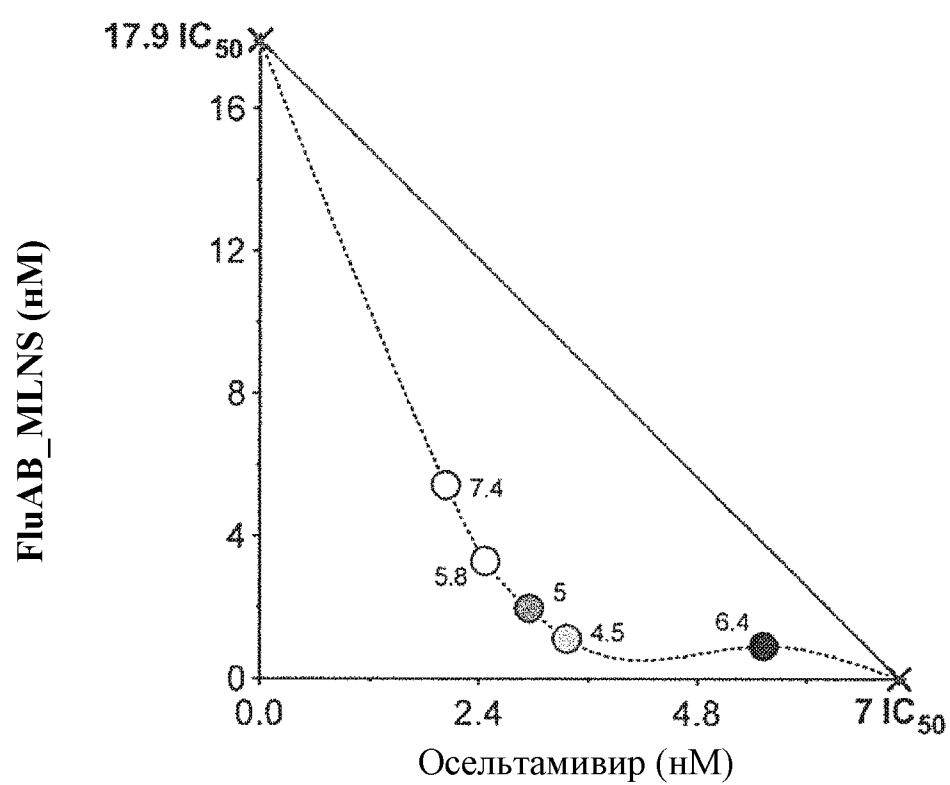


Фиг. 12Д

Соотношения

- 1:6
- ◐ 1:3
- 1:1.5
- ◑ 1:0.75
- 1:0.37

H1N1

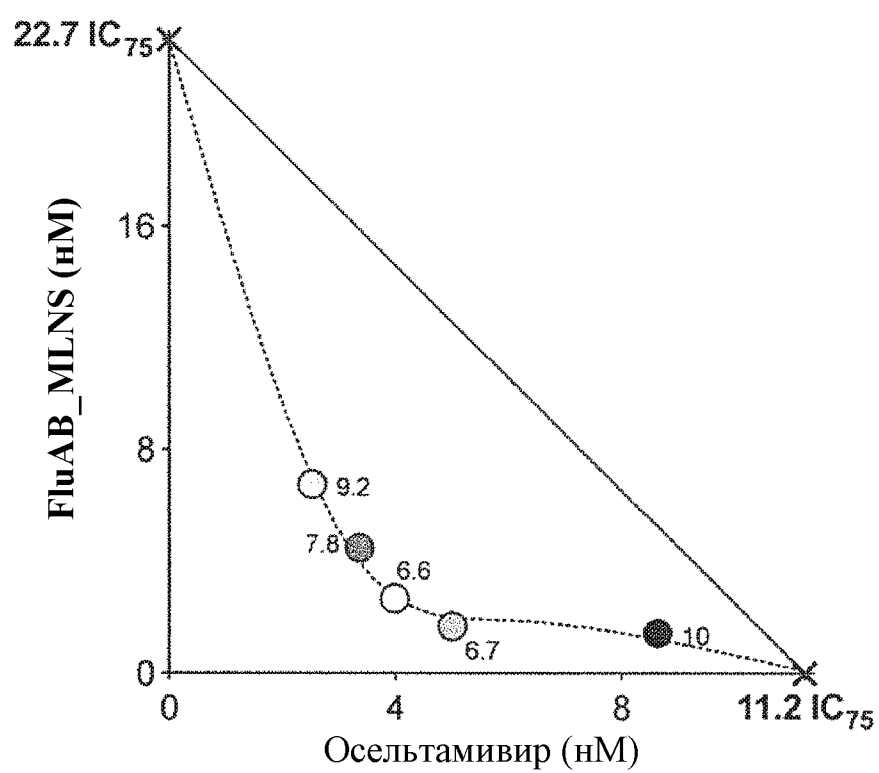
IC₅₀

Фиг. 13А

Соотношения

- 1:6
- ◐ 1:3
- 1:1.5
- ◑ 1:0.75
- 1:0.37

H1N1

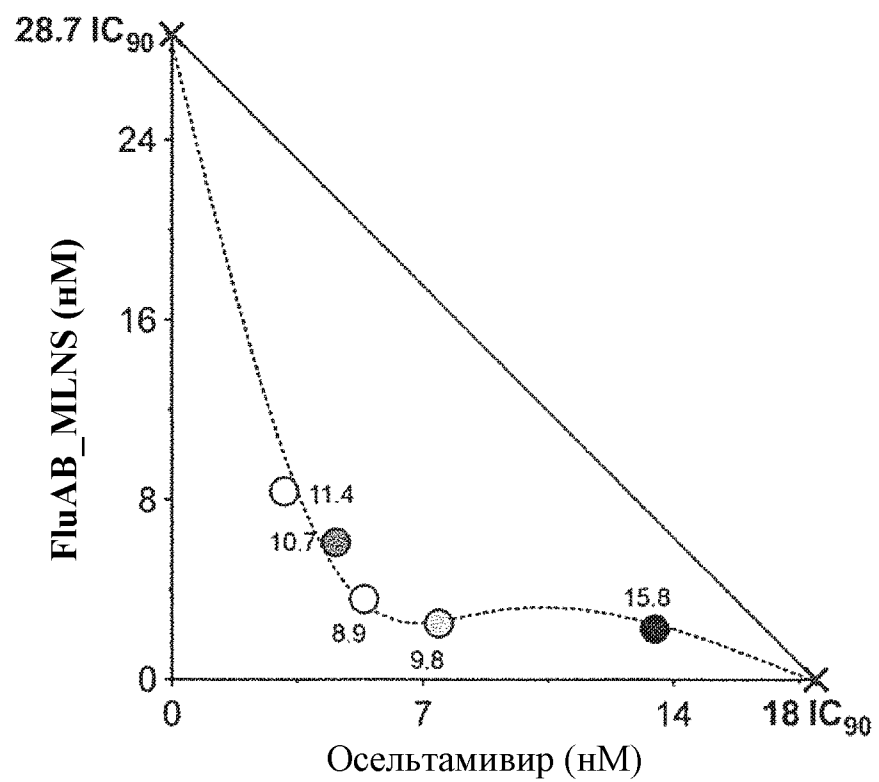
IC₇₅

Фиг. 13Б

Соотношения

- 1:6
- ◐ 1:3
- 1:1.5
- ◑ 1:0.75
- 1:0.37

H1N1

IC₉₀

Фиг. 13В

23/67

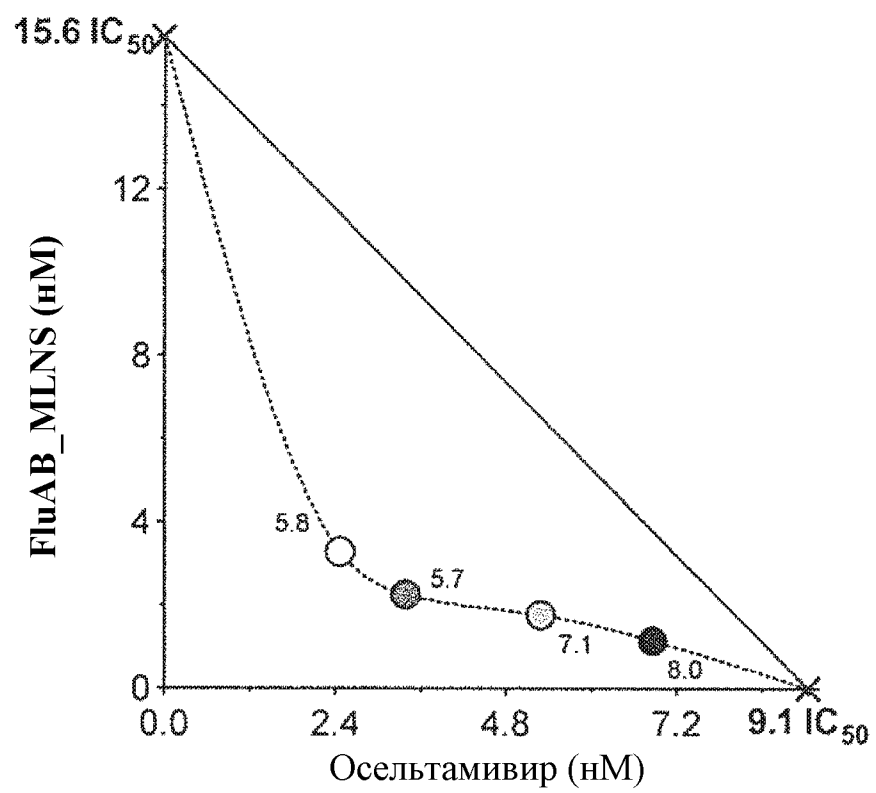
OS: FluAB_MLNS

соотношения

- 6
- 3
- 1.5
- 0.75

H3N2

IC₅₀



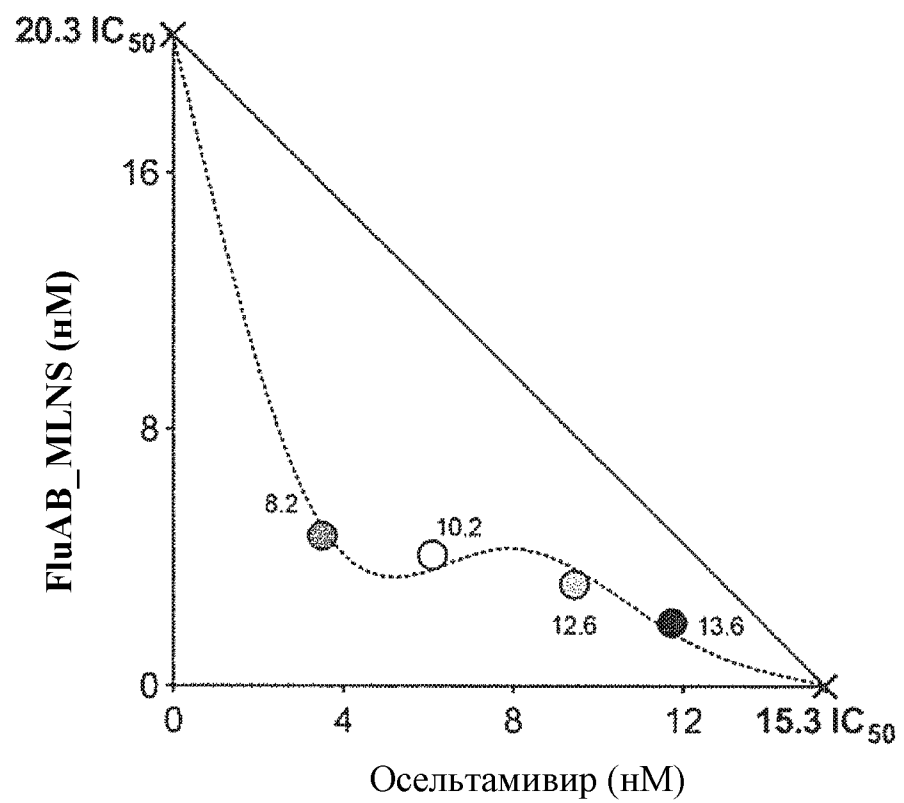
Фиг. 14А

OS: FluAB_MLNS

соотношения

- 6
- 3
- 1.5
- 0.75

H3N2

IC₇₅

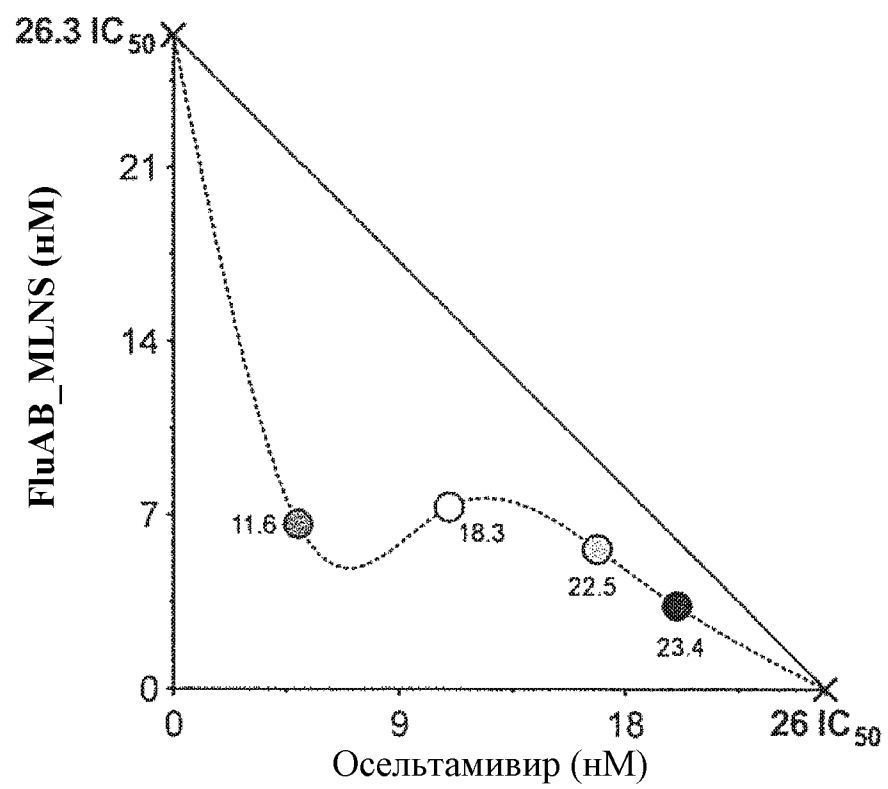
Фиг. 14Б

OS: FluAB_MLNS

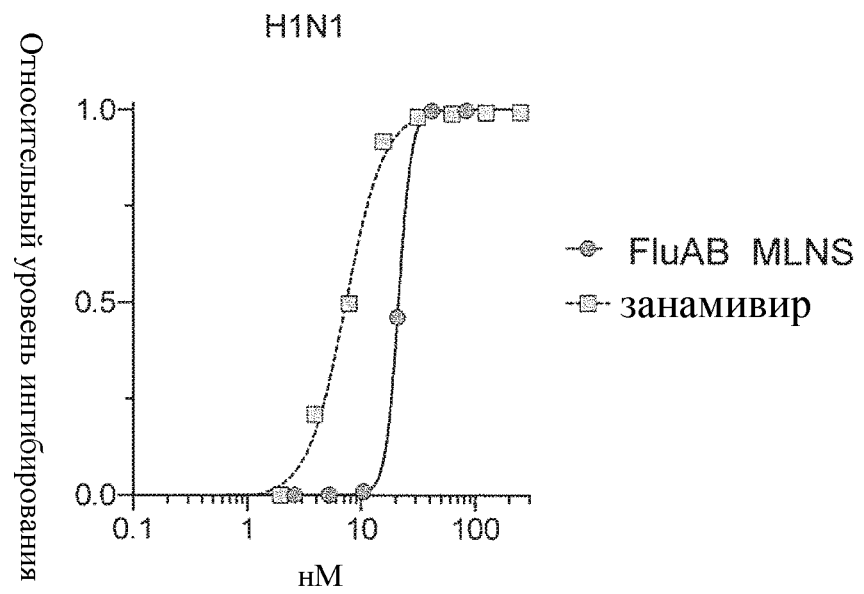
соотношения

- 6
- 3
- 1.5
- 0.75

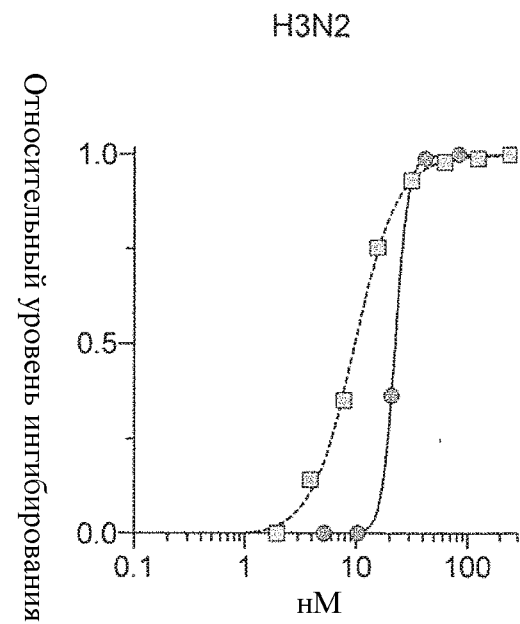
H3N2

IC₉₀

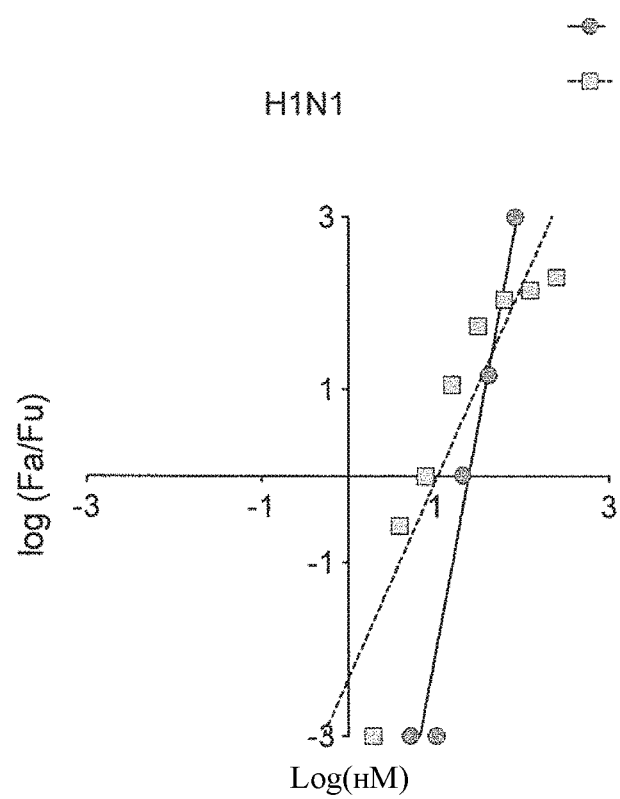
Фиг. 14В



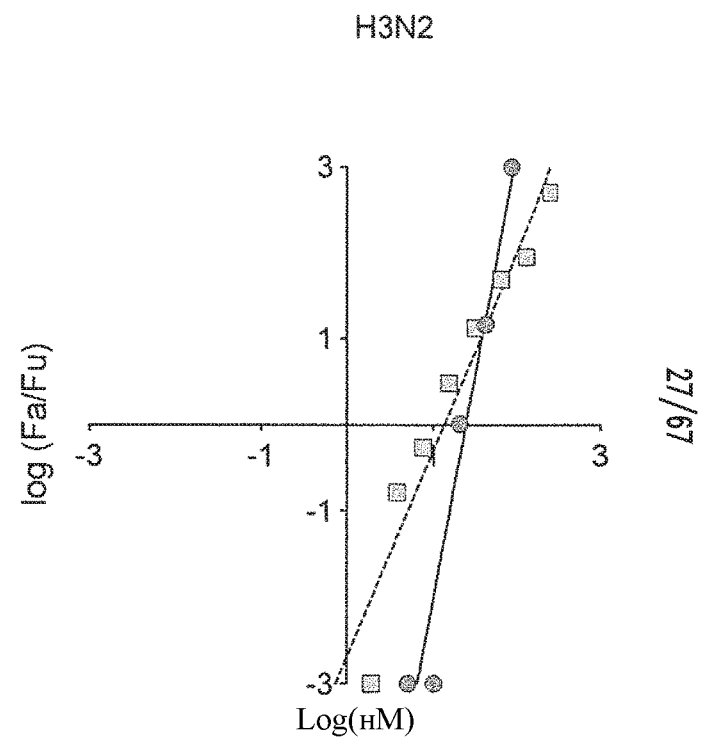
Фиг. 15А



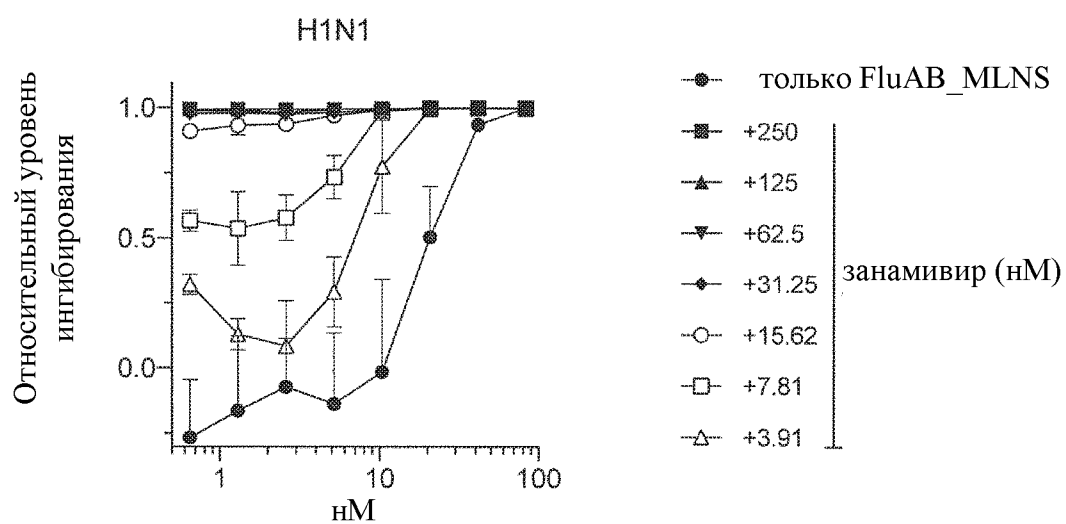
Фиг. 15Б



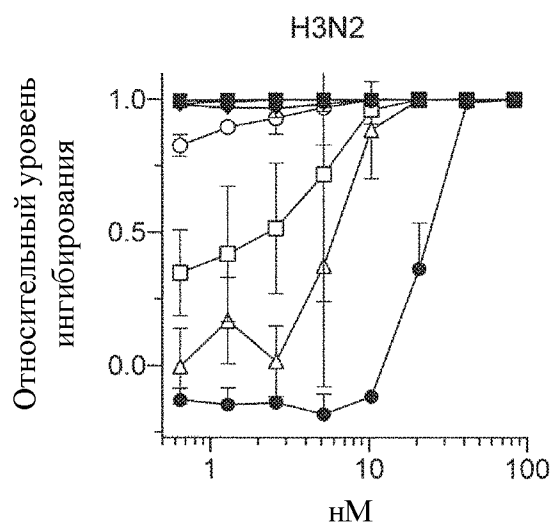
Фиг. 15В



Фиг. 15Г

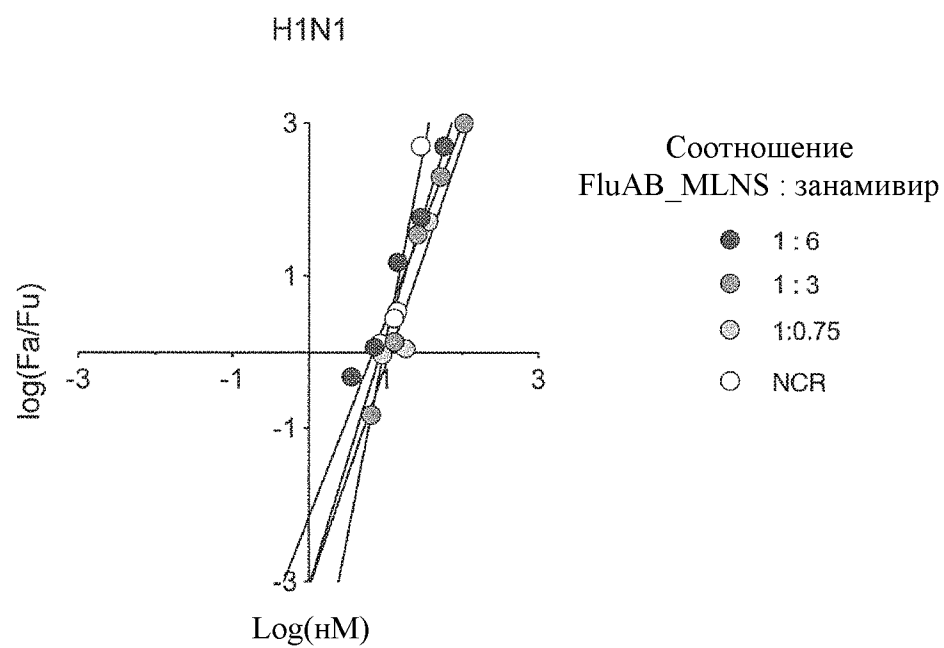


Фиг. 16А

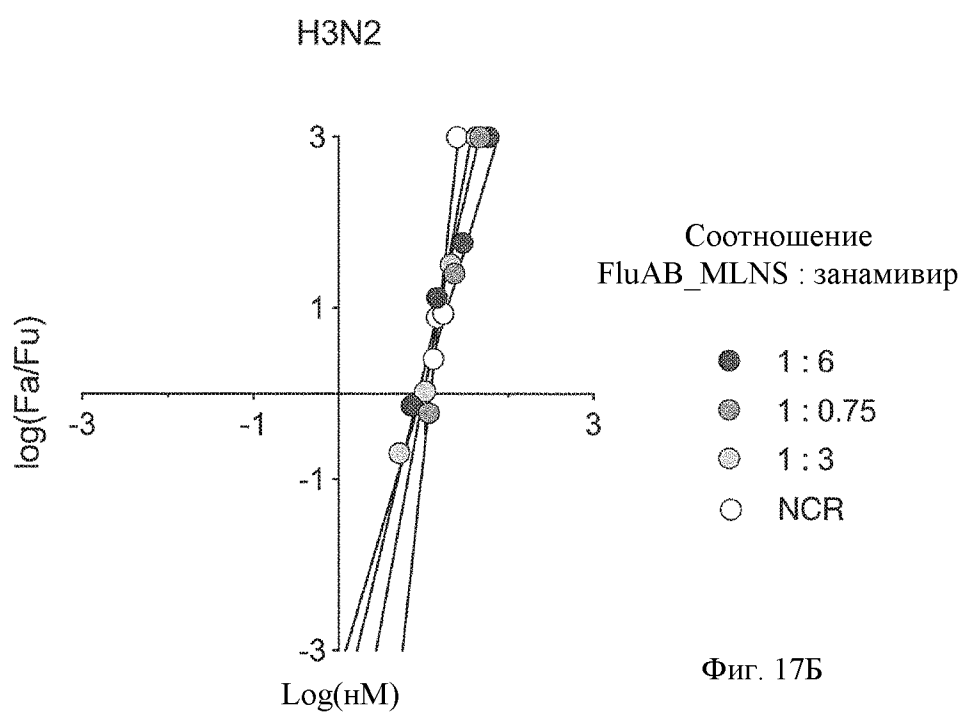


Фиг. 16Б

29/67

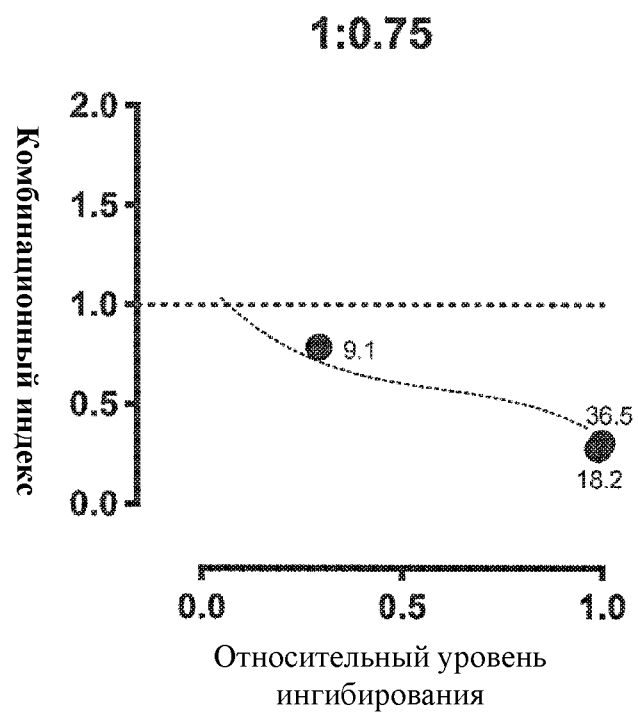


Фиг. 17А

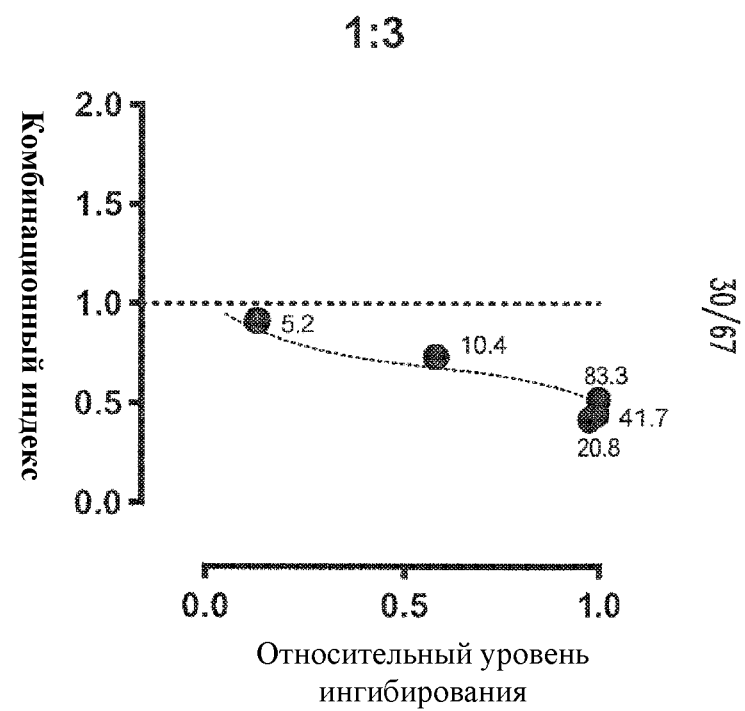


Фиг. 17Б

H1N1



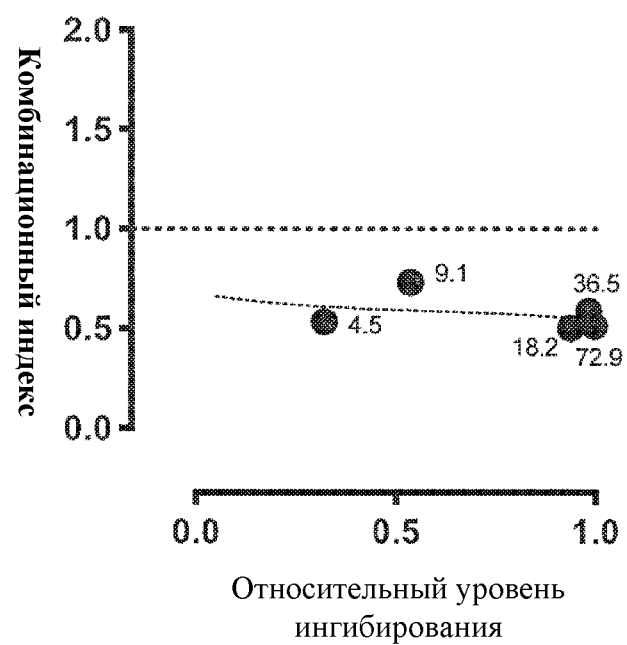
Фиг. 18А



Фиг. 18Б

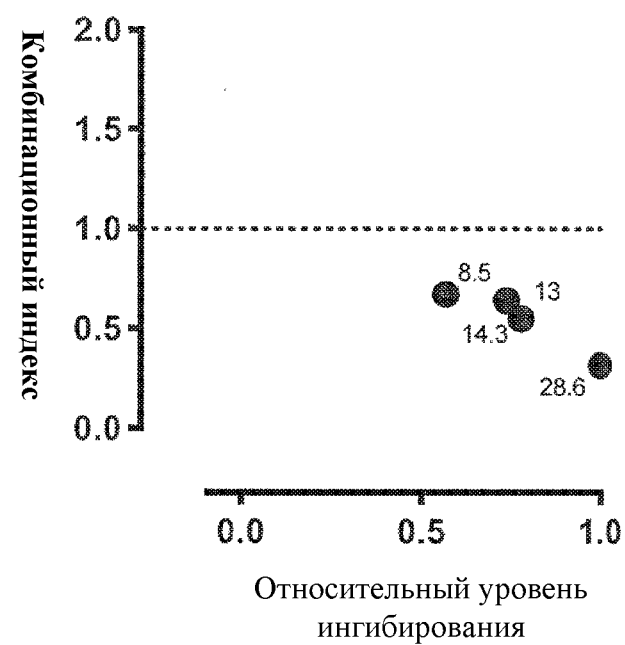
H1N1

1:6



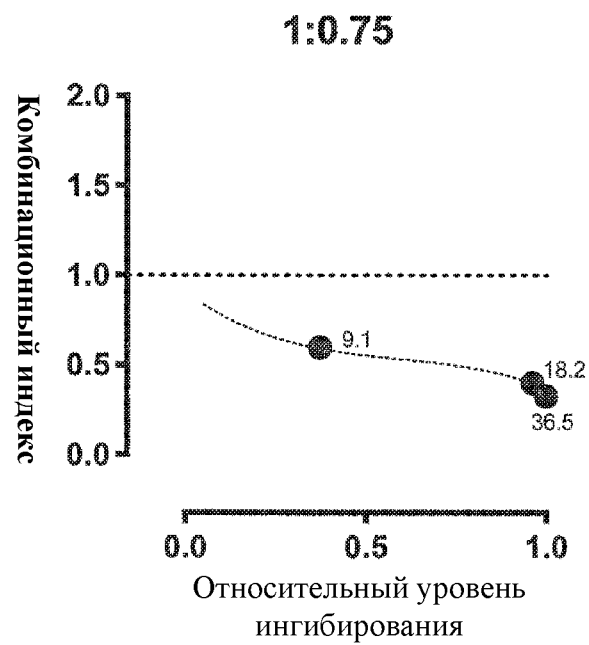
Фиг. 18В

NCR

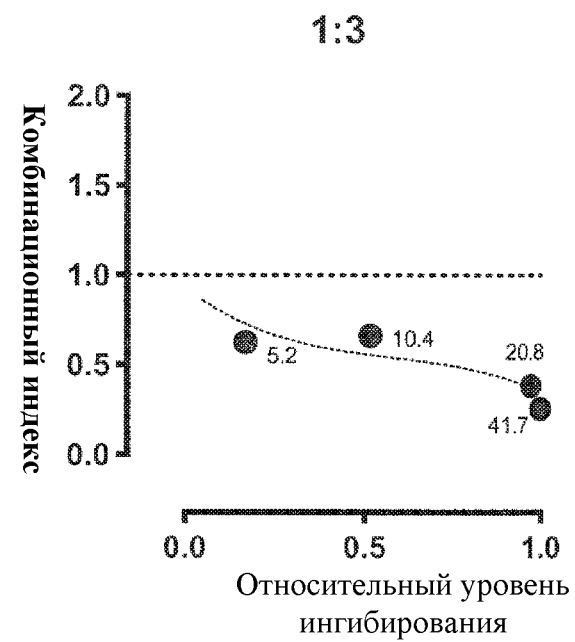


Фиг. 18Г

H3N2

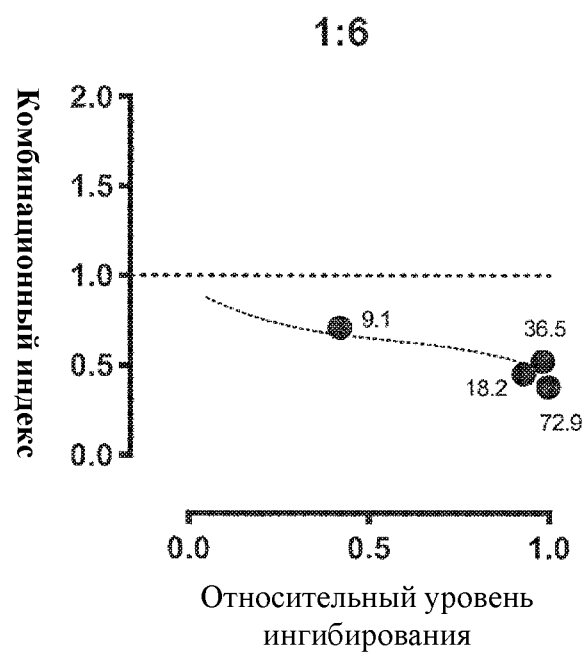


Фиг. 119А



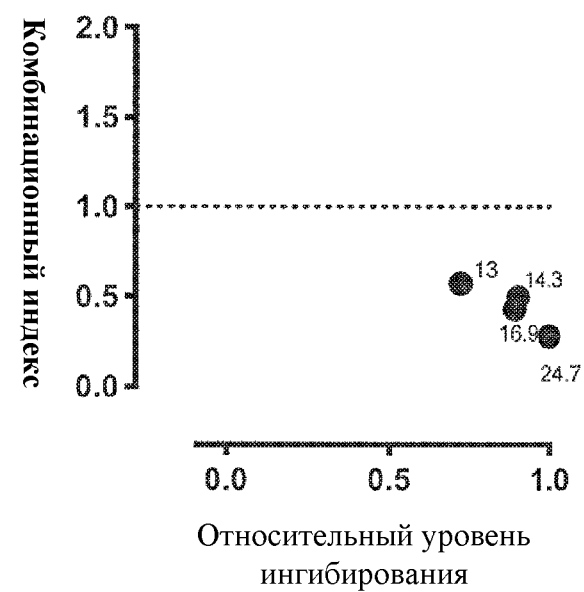
Фиг. 119Б

H3N2



Фиг. 119В

NCR



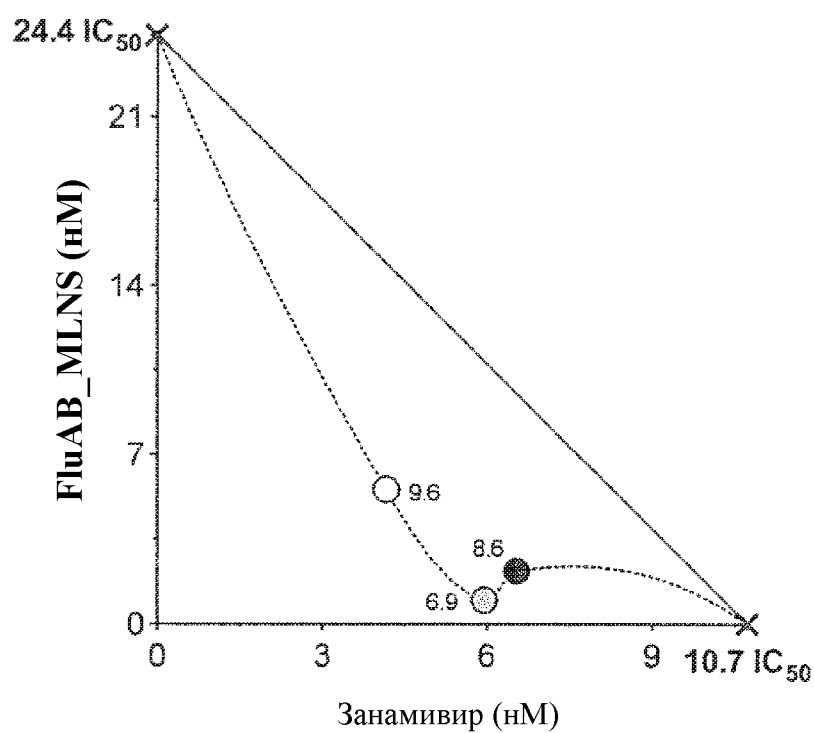
Фиг. 119Г

Соотношение
FluAB_MLNS : занамивир

- 1 : 3
- 1 : 6
- 1 : 0.75

H1N1

IC₅₀



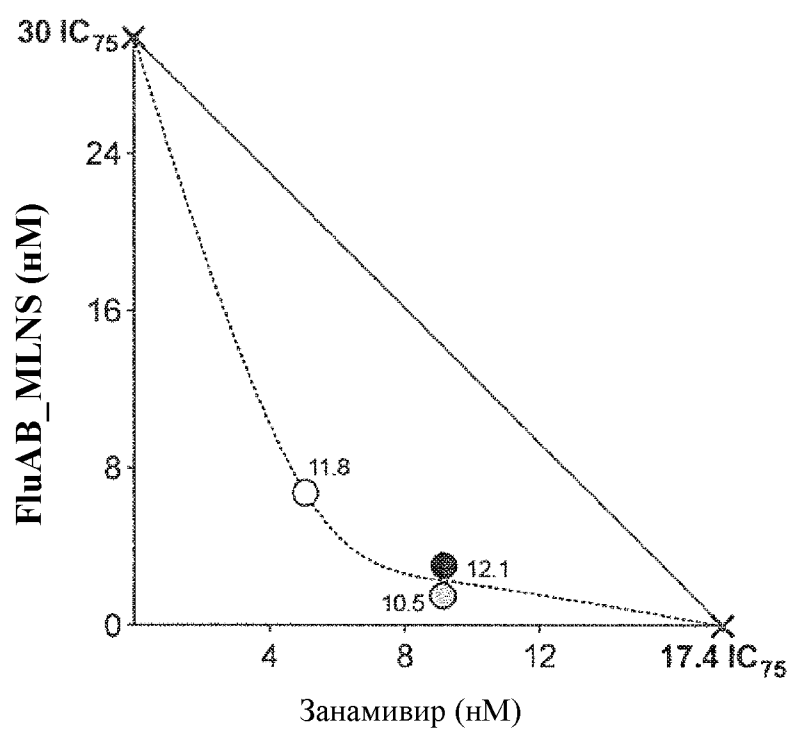
Фиг. 20А

Соотношение
FluAB_MLNS : занамивир

- 1 : 3
- 1 : 6
- 1 : 0.75

H1N1

IC₇₅



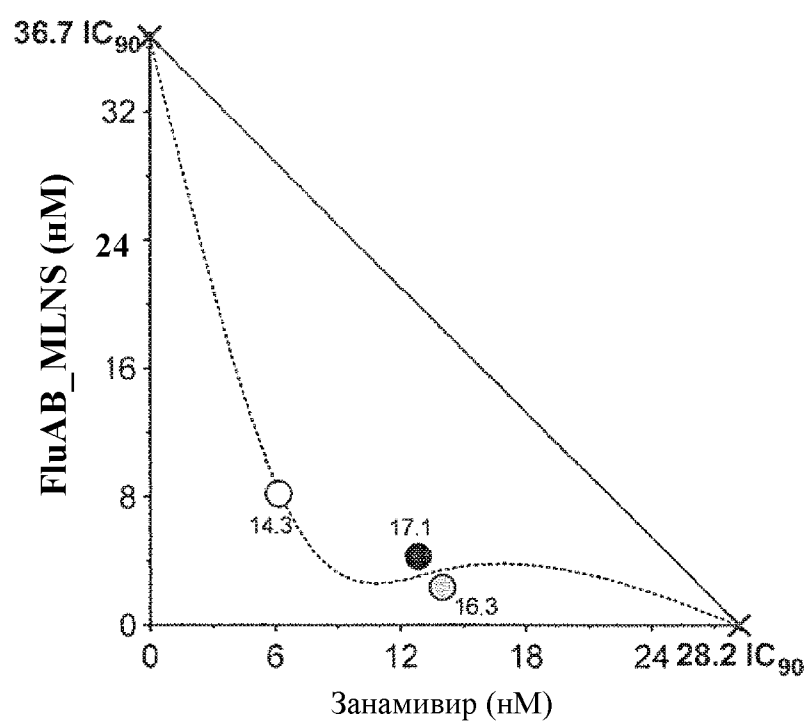
Фиг. 20Б

Соотношение
FluAB_MLNS : занамивир

- 1 : 3
- 1 : 6
- 1 : 0.75

H1N1

IC₉₀



Фиг. 20В

37/67

Соотношение
FluAB_MLNS : занамивир

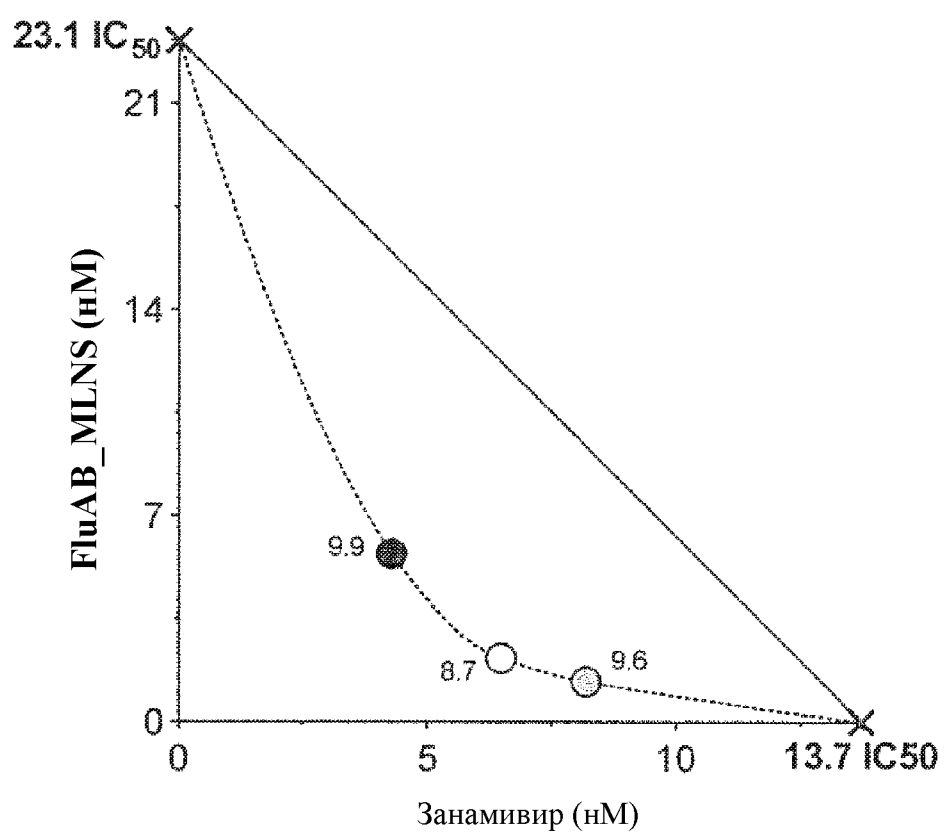
● 1 : 0.75

⊙ 1 : 6

○ 1 : 3

H3N2

IC₅₀



Фиг. 21А

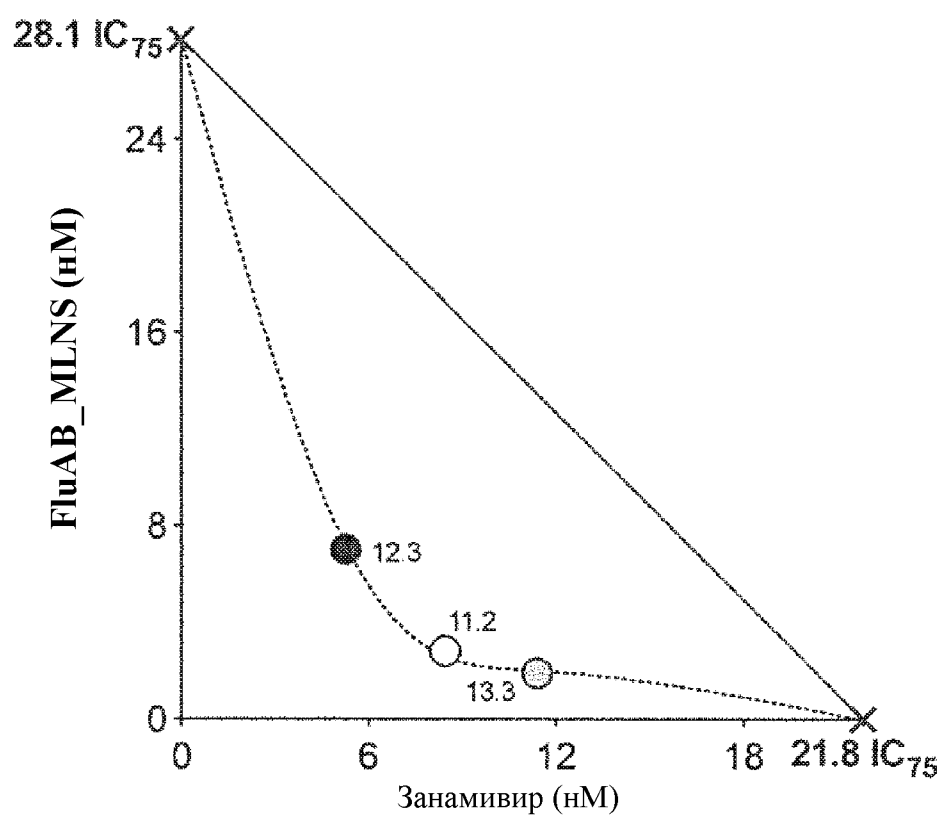
38/67

Соотношение
FluAB_MLNS : занамивир

- 1 : 0.75
- ⊙ 1 : 6
- 1 : 3

H3N2

IC₇₅



Фиг. 21Б

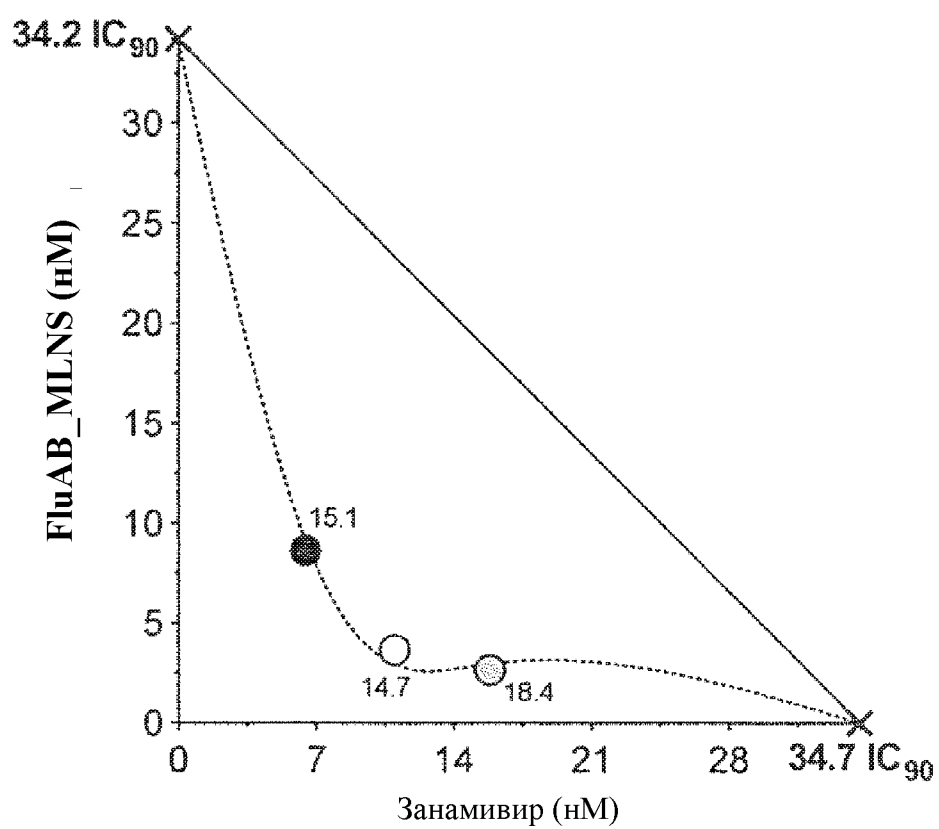
39/67

Соотношение
FluAB_MLNS : занамивир

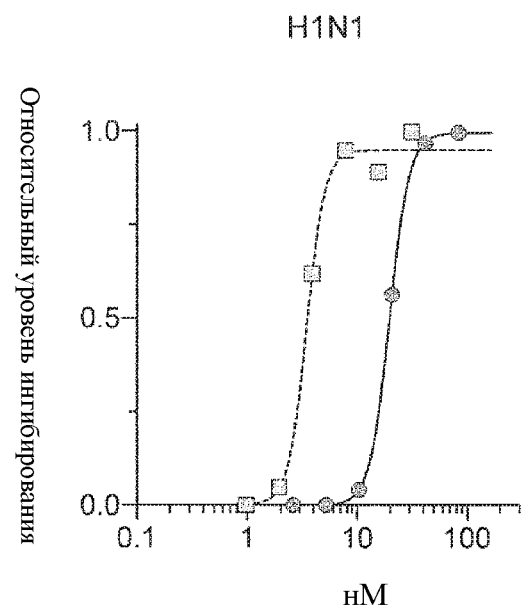
- 1 : 0.75
- 1 : 6
- 1 : 3

H3N2

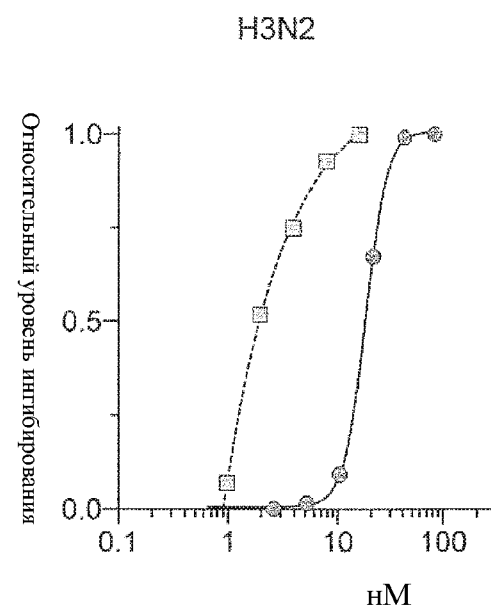
IC₉₀



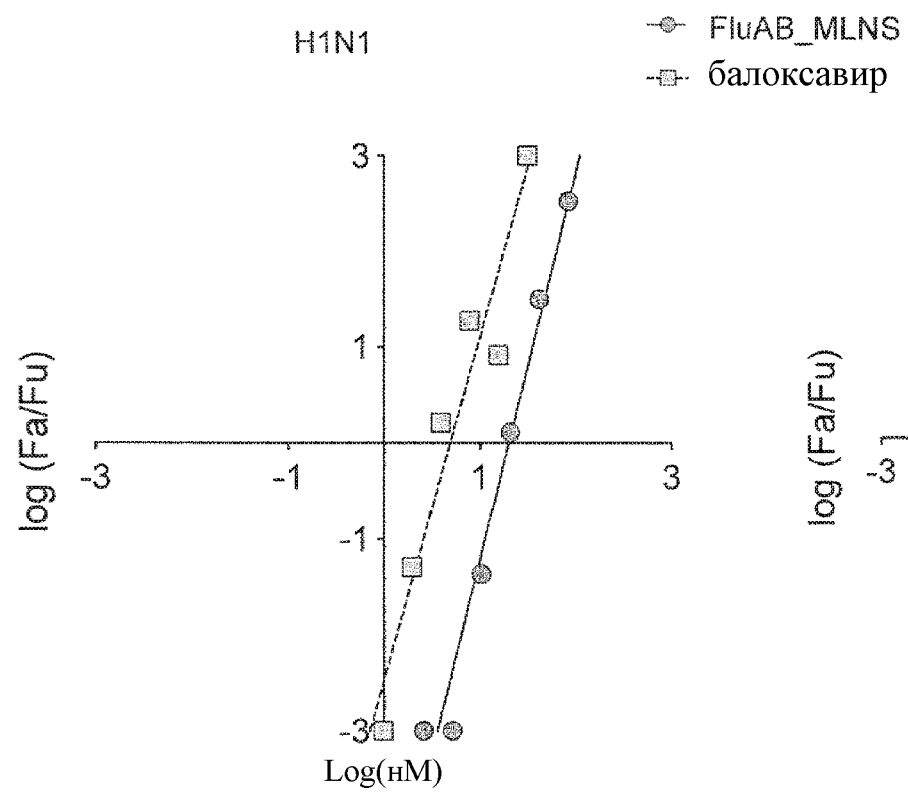
Фиг. 21В



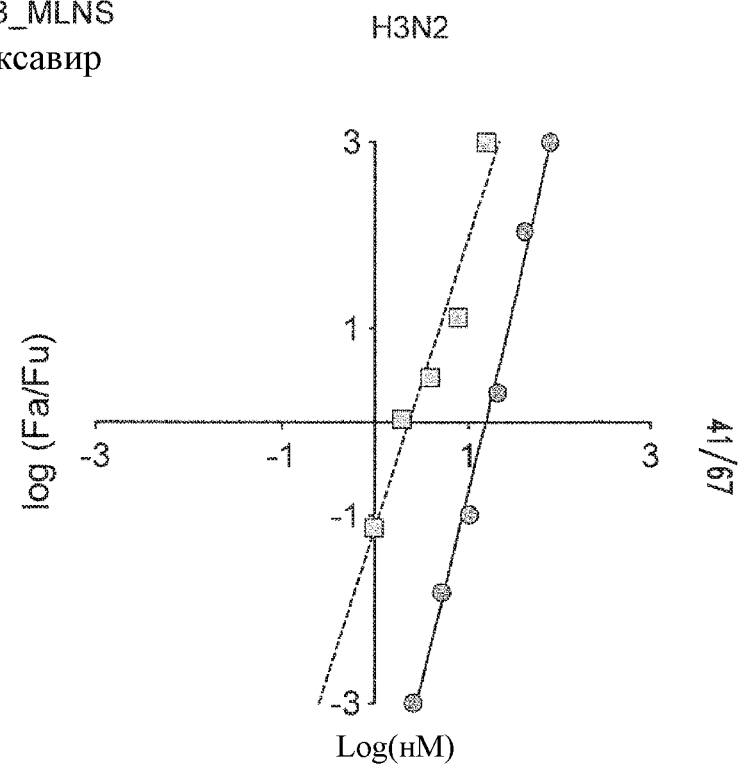
Фиг. 22А



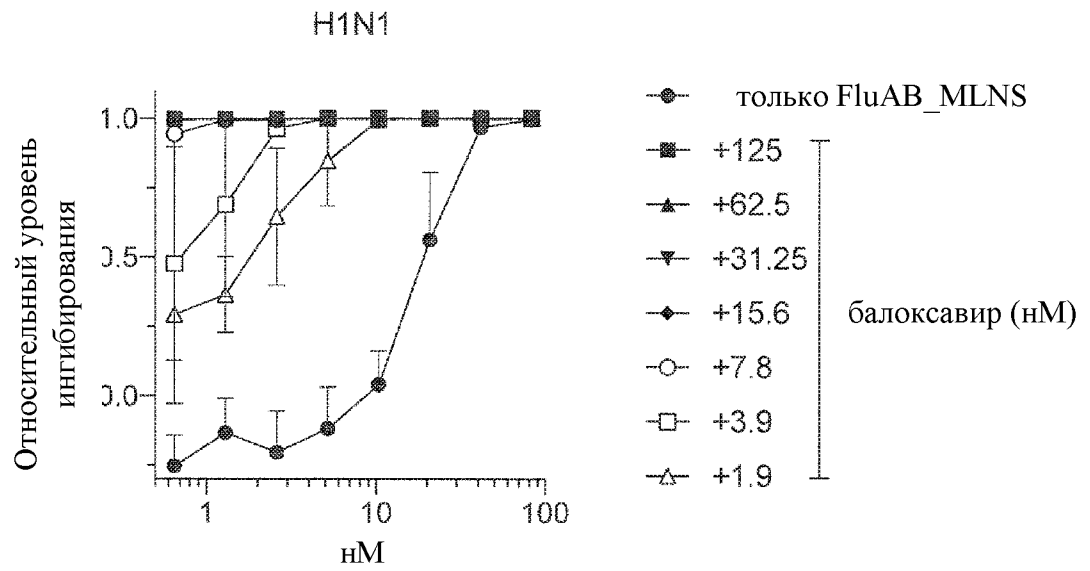
Фиг. 22Б



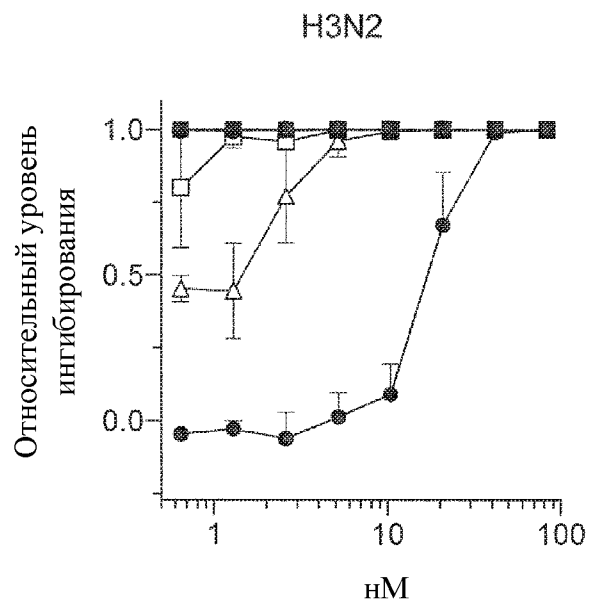
Фиг. 22В



Фиг. 22Г

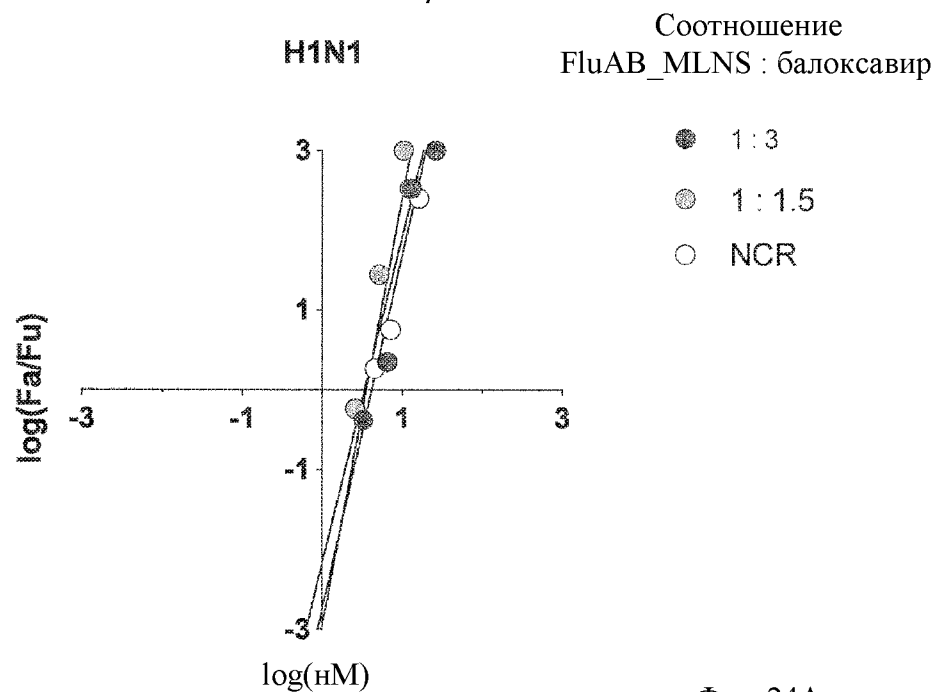


Фиг. 23А

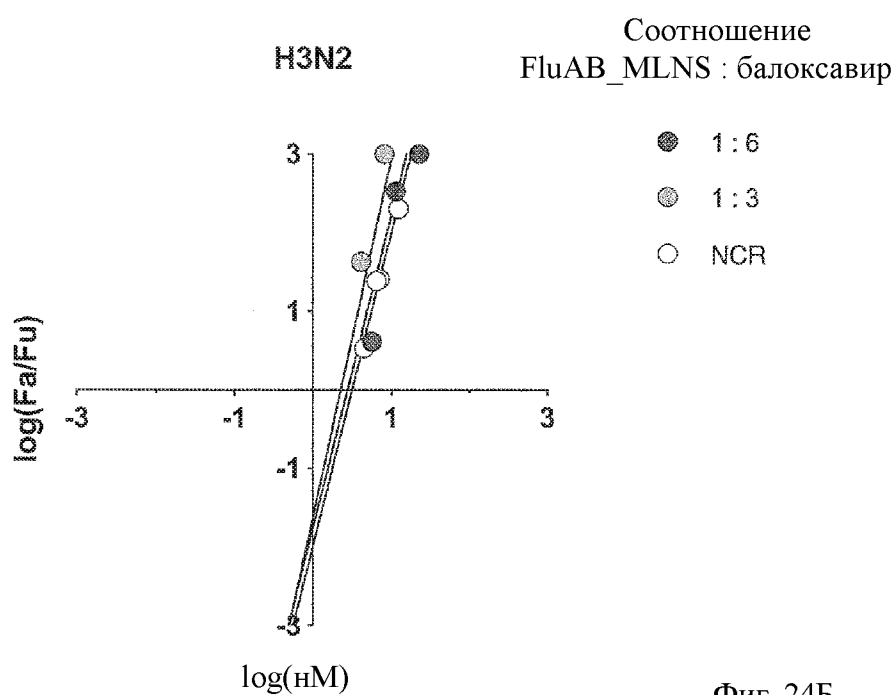


Фиг. 23Б

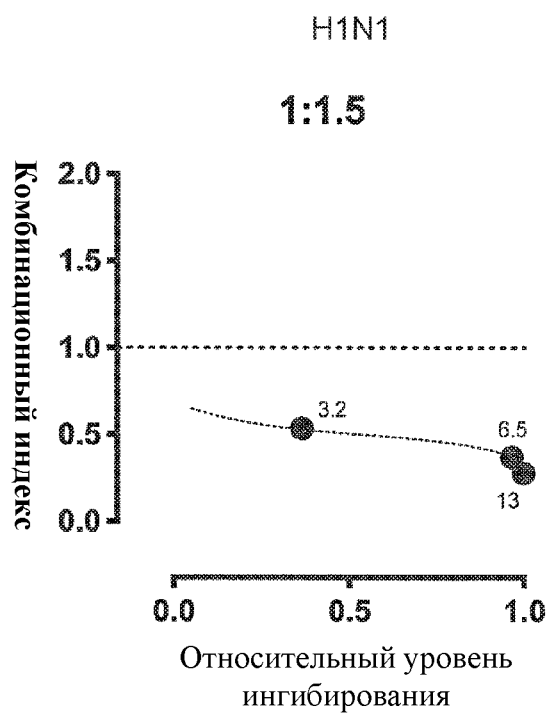
43/67



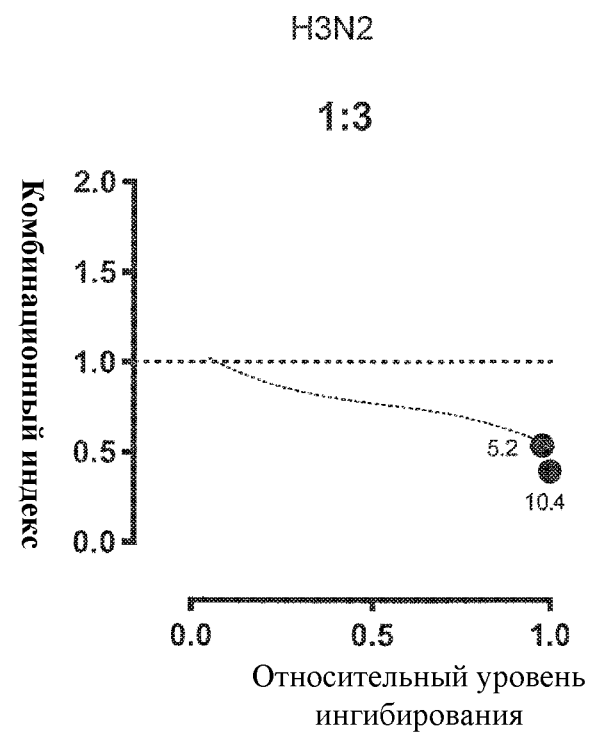
Фиг. 24А



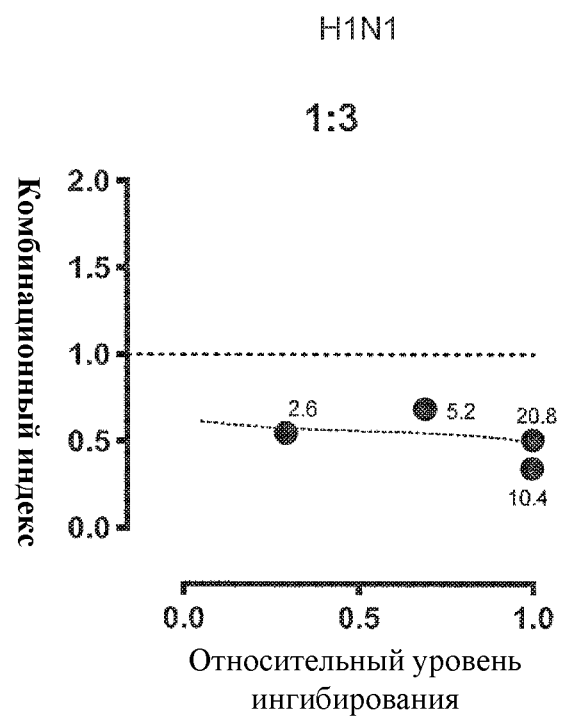
Фиг. 24Б



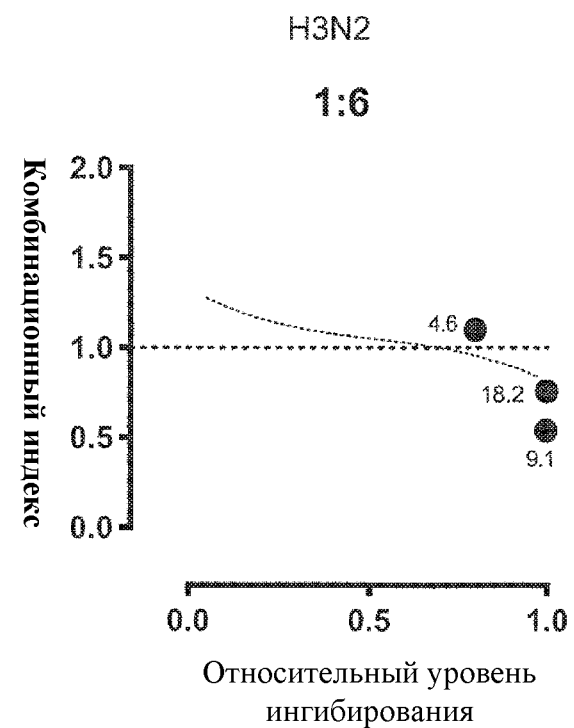
Фиг. 25А



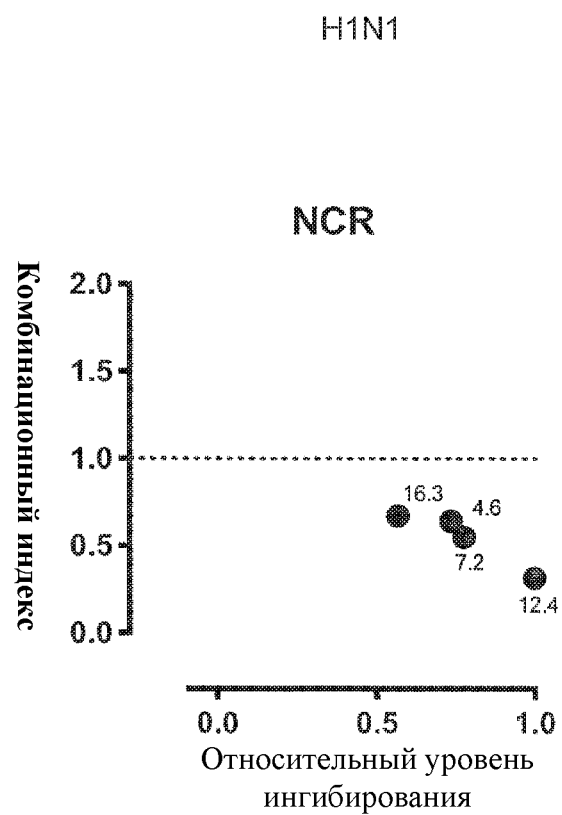
Фиг. 25Б



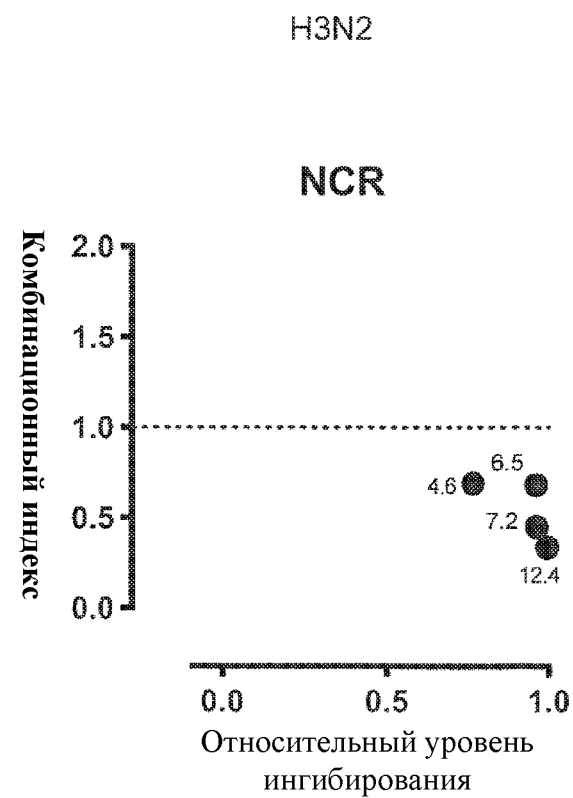
NCR
Фиг. 25В



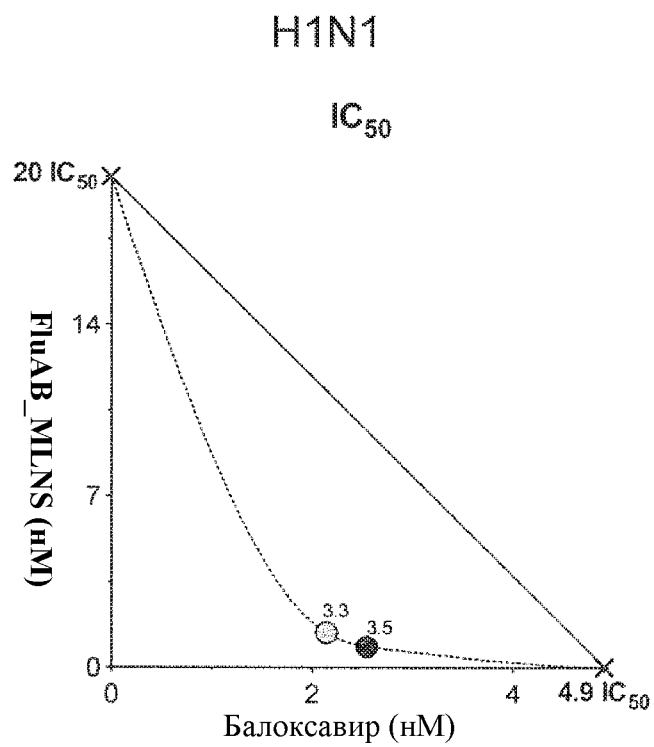
NCR
Фиг. 25Г



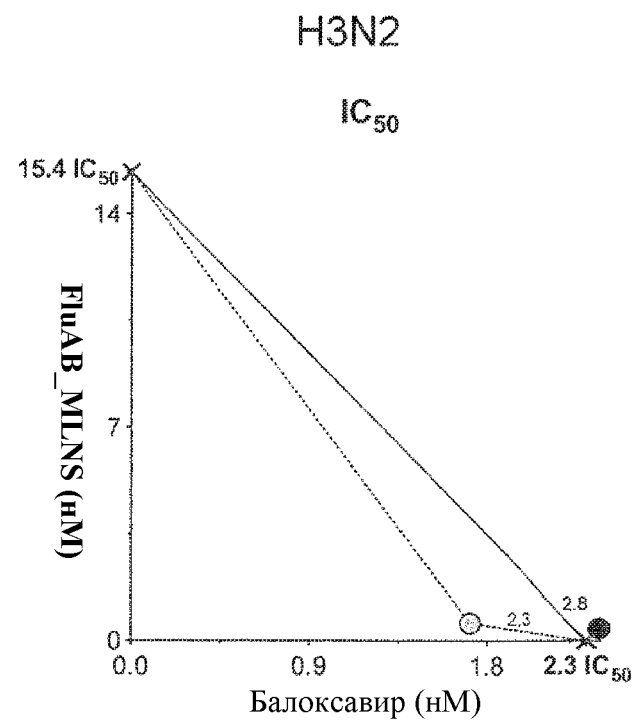
Фиг. 25Д



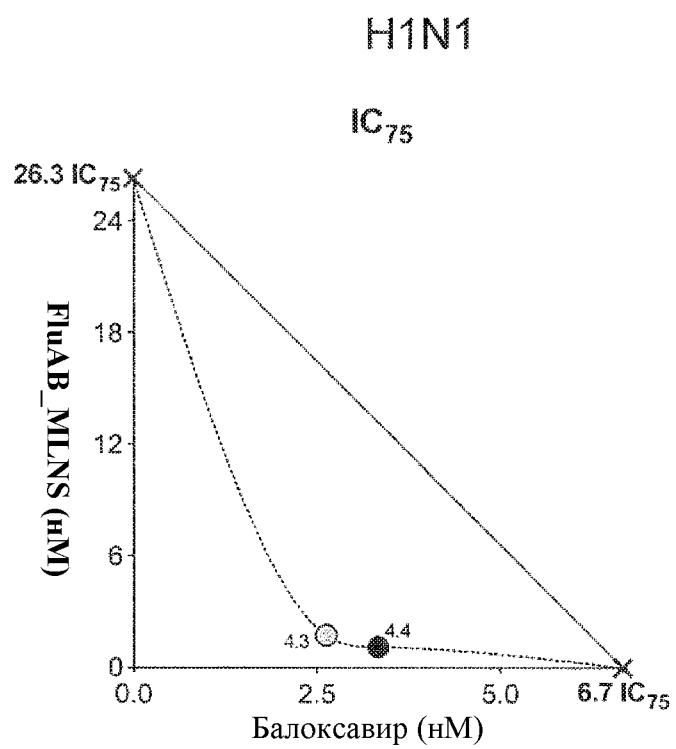
Фиг. 25Е



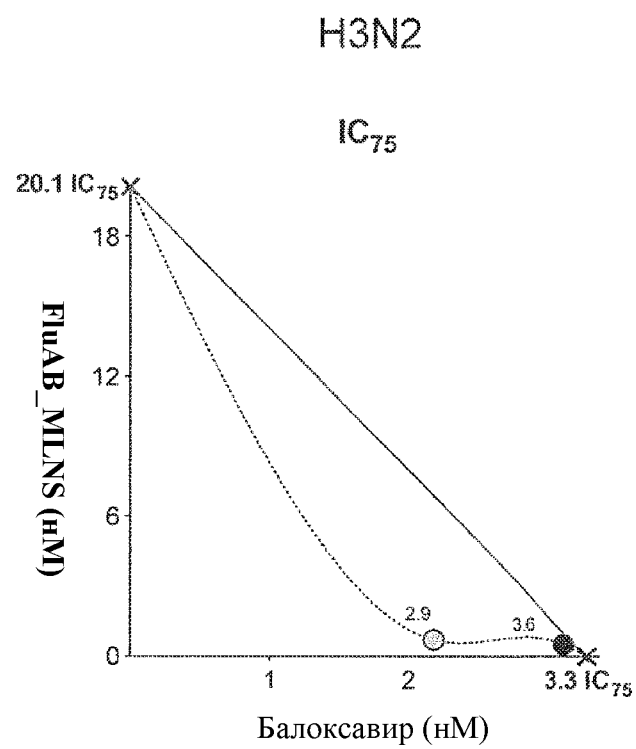
Фиг. 26А



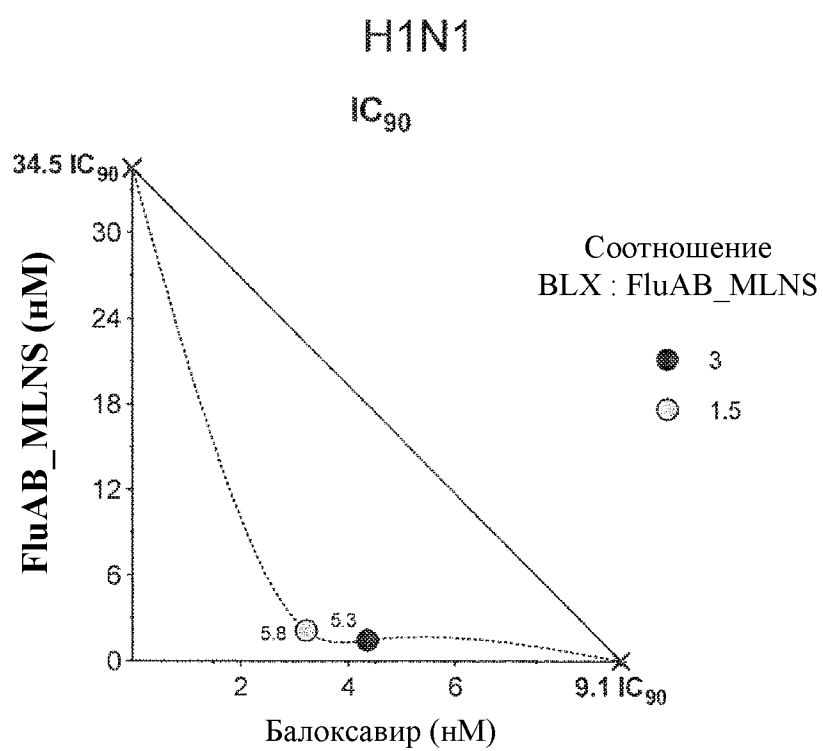
Фиг. 26Б



Фиг. 26В

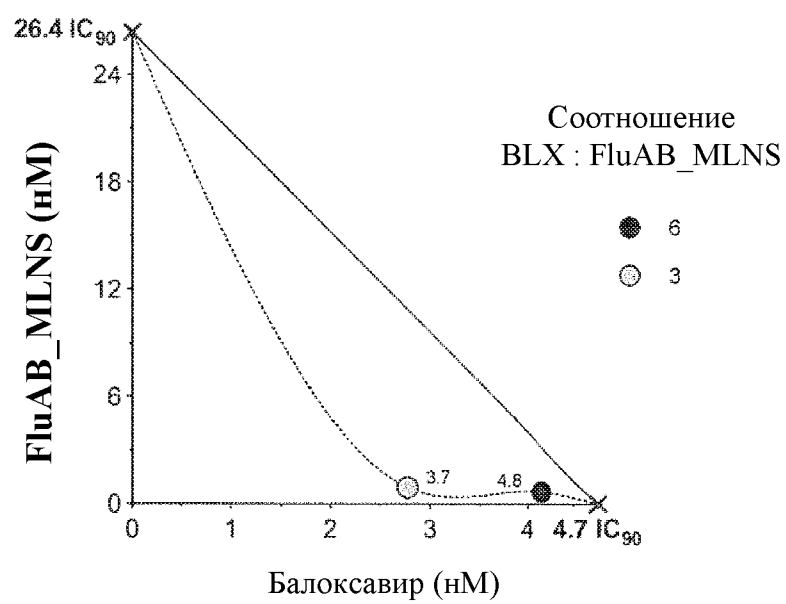


Фиг. 26Г



Фиг. 26Г

H3N2

IC₉₀

Фиг. 26Е

Стадия исследования	Пробывание в стационаре [†]														
	Скрининг					Период последующего наблюдения									
Неделя визита при проведении исследования						W1	W2	W4	W6	W8	W12	W20	W34	W52 (EOS)/ET	
День визита ± окно визита при проведении исследования	D-28 to-2	D-1 ^k	D1	D2	D3	D8±1	D15±2	D29±2	D43±3	D57±4	D85±7	D141±7	D239±7	D365±7	
Информированное согласие	X														
Демография	X														
История болезни	X														
Критерии включения/исключения	X	X													
Медицинский осмотр ^a	X	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X	
Вес тела, рост и BMI	X														
Назофарингеальный мазок для оценки переносимости процедуры	X														
Серология (HBV/HCV/HIV)	X														
Моча для анализа на наркотики	X	X													
Жизненно важные показатели ^o	X		X ^b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
ЭКГ с 12 отведениями ^b	X		X ^c												
Лабораторные анализы ^f	X ^d	X				X		X		X		X	X	X	
Тест на беременность ^k	X	X												X	
Рандомизация			X												
Введение исследуемого лек. средства			X												
Местная переносимость			X ^f	X	X	X									
Анализ BUN (сыворотка) ^ж			X ^g	X	X	X	X	X		X	X		X		
Образец крови для анализа ФК ^ж			X ^g	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Назофаринг. мазок для анализа ФК ^ж			X	X	X	X	X	X		X	X		X		
Антитело к лек. преп-ту (сыворотка)			X ^b				X	X		X		X	X	X	
Тип антитела к вирусу гриппа А (сыв-ка) ^{c,†}			X ^b					X							

Фиг. 27А

Стадия исследования	Пробывание в стационаре ^l														
	Скрининг					Период последующего наблюдения									
Неделя визита при исследовании						W1	W2	W4	W6	W8	W12	W20	W34	W52 (EOS)/ET	
День визита ± окно визита при исследовании	с D -28 по -1	D -1 ^k	D1	D2	D3	D8±1	D15±2	D29±2	D43±3	D57±4	D85±7	D141±7	D239±7	D365±7	
Наблюдение за симптомами ILI ⁱⁱ						X									
Обзор/регистрация НЯ						X									
Сопутствующие лек. средства						X									

^a медицинские осмотры (МО) в период со дня -1 до W34 (включительно) должны быть ориентированы на выявление симптомов

^b в день 1 жизненно важные показатели следует измерять в течение 1 ч перед дозированием и 1 ч после дозирования

^v в день 1 ЭКГ должны быть получены в течение ≤15 мин перед дозированием и ≤30 мин после дозирования

^r см. описание лабораторных тестов в примере 7; INR, PT и PTT должны быть измерены только при скрининге; анализ мочи должен быть сделан только при скрининге, в день 1 (перед дозированием) и при визитах в 1, 2, 4 и 8 неделю

^d применимо для женщин с детородным потенциалом; анализ сыворотки на беременность должен быть проведен при первом скрининге и после этого должны быть проведены анализы мочи на беременность

^c оценку местной переносимости следует проводить примерно через 30 мин, 2 ч, 12 ч, 24 ч и 48 ч после введения дозы

^ж см. в примере 7 моменты времени определения ФК

^з в день 1 образец должен быть получен перед дозированием

ⁱⁱ субъекты должны осуществлять наблюдение за симптомами ILI в день 3 и продолжать дважды в неделю до окончания исследования

^k см. описание инструкций по отчетности в примере 7

^l субъекты должны быть допущены для участия в исследовании в день -1 и помещены в стационар по меньшей мере за 12 ч до дозирования, и выписаны после завершения оценок в день 3.

Фиг. 27Б

Стадия исследования	Скрининг	Дозирование	Период последующего наблюдения				
Неделя визита при исследовании			W2	W4	W8	W12	W24 (EOS)/ET
День визита ± окно визита при исследовании	с D -28 по -1	D1	D15±2	D29±2	D57±7	D85±7	D169±7
Информированное согласие	X						
История болезни	X						
Критерии включения/исключения	X	X					
Медицинский осмотр ^a	X	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X
Вес тела, рост и BMI	X						
Жизненно важные показатели ^o	X	X ^b	X	X	X	X	X
ЭКГ с 12 отведениями ^o	X	X ^c					
Лабораторные анализы ^r	X ^d	X ^f	X	X	X	X	X
Тест на беременность ^d	X	X ^f					X
Тип антигена к вирусу гриппа А (сыв-ка) ^e		X ^f		X			
Моча для анализа на наркотики	X						
Введение исследуемого лек. средства		X					
Образец крови для анализа ФК ^ж		X ^f	X	X	X	X	X
Антитело к лек. препарату (сыворотка)		X ^f	X	X	X	X	X
Наблюдение за симптомами ILI [*]			X ^g				
Просмотр/регистрация НЯ			X				
Сопутствующие лек. средства			X				

Фиг. 28А

^а медицинские осмотры в день 1 и в течение недель 2, 4, 8 и 12 должны быть ориентированы на выявление симптомов
^б в день 1 жизненно важные показатели следует измерять в течение 1 ч перед дозированием и 1 ч после дозирования
^в в день 1 ЭКГ должны быть получены в течение ≤ 15 мин перед дозированием и ≤ 30 мин после дозирования
^г см. описание лабораторных тестов в примере 7; INR, PT и PTT должны быть измерены только при скрининге; анализ мочи должен быть сделан только при скрининге, в день 1 (перед дозированием) и при визитах в 1, 2, 4 и 8 неделю
^д применимо для женщин с детородным потенциалом; анализ сыворотки на беременность должен быть проведен при первом скрининге и после этого должны быть проведены анализы мочи на беременность
^е в день 1 образец должен быть получен перед дозированием
^ж наблюдение за симптомами ILI должно продолжаться (таким же образом, что и в части А) дважды в неделю до окончания исследования.

Стадия исследования	Скрининг	Дозирование		Период последующего наблюдения		
Визит при исследовании ± окно визита	с D -28 по D -1	D1	Дважды в неделю	W4 ± 1 неделя	W12 ± 2 недели	конец сезона +2 недели (EOS)/ET
Информированное согласие	X					
Демография	X					
История болезни	X					
Критерии включения/исключения	X	X				
Медицинский осмотр ^a	X	X ^a		X ^a	X ^a	X
Вес тела, рост и BMI	X					
Жизненно важные показатели ^b	X	X ^b		X	X	X
ЭКГ с 12 отведениями	X					
Лабораторные анализы ^a	X ^c			X	X	X
Тест на беременность ^f	X	X ^g				X
Титр антител к вирусу гриппа A ^d		X ^g				X
Образец крови для анализа ФК				X	X	X
Антитело к лек. препарату (сыворотка)		X ^g		X	X	X
Генотипирование (сыворотка)		X ^g				
Исследуемые биомаркеры (сыворотка)		X ^g				X
Рандомизация		X				
Введение исследуемого лек. средства		X			X ^f	
Наблюдение за симптомами ILI			X			
Обзор/регистрация НЯ*					X	
Сопутствующие лек. средства					X	

Фиг. 29А

- ^а медицинские осмотры в день 1 и в течение недели 4 и недели 12 должны быть ориентированы на выявление симптомов
- ^б в день 1 жизненно важные показатели следует измерять в течение 1 ч перед дозированием и 1 ч после дозирования
- ^в см. описание лабораторных тестов в примере 7; INR, PT и PTT должны быть измерены только при скрининге;
- ^г применимо для женщин с детородным потенциалом; анализ сыворотки на беременность должен быть проведен при первом скрининге и после этого должны быть проведены анализы мочи на беременность
- ^д в день 1 образец должен быть получен перед дозированием
- ^е только в том случае, когда уровень доз требует осуществления дополнительной инъекции
- ^ж см. описание инструкций по отчетности в примере 7

Дни после начала симптомов ILI	ILI-D1	ILI-D2	ILI-D3	ILI-D4	ILI-D5	ILI-D6	ILI-D7	ILI-D8	ILI-D9	ILI-D10	ILI-D28 ± 3 дня
Симптом-ориентированное МО	X										X
Жизненно важные показатели	X										
Титр антител к вирусу гриппа А	X										X
Вирусология назофарингеального мазка	X										
Подтверждение гриппа А	X										
Образец крови для анализа ФК	X										
Антитело к лек. препарату (сыв-ка)	X										
Лабораторные анализы ^a	X										
Исследуемые биомаркеры (сыв-ка)	X										X
Самостоятель. температуры в полости рта ^б	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Опросник WPAI ^в	X							X			
Опросник о серьезности симптомов гриппа ^б	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Последующие контакты с индивидуумом (тел. звонок с сайта ^г)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Обзор/регистрация НЯ	X										
Сопутствующие лек. средства	X										

^a только панели гематологических, химических анализов и анализов печеночной функции из числа лабораторных анализов, перечисленных в пример 7;

^б температуру следует измерять и регистрировать с помощью электронного устройства дважды в день;

^в опросник по оценке симптомов гриппа следует заполнять с помощью электронного устройства дважды в день вплоть до и включая ILI-D10; опросник WPAI следует заполнять в дни ILI-D1 и ILI-D8 с помощью электронного устройства;

^г индивидуумов следует опрашивать, если они получают требующую медицинского вмешательства помощь для лечения ILI вне места клинического исследования, по телефону и в ходе визитов в клинику в дни ILI-D1 и ILI-D28

Фиг. 30

День/неделя исследования	Время согласно протоколу	Кровь для ФК (сыворотка)	Анализ BUN (сыворотка)	Назофарингеальный мазок для ФК
День/неделя	Перед дозированием (≤ 5 мин)	X		
	Через 1 ч после дозирования	X		
	Через 2 ч после дозирования	X	X	X
	Через 6 ч после дозирования	X		
	Через 12 ч после дозирования	X		X
День 2	Через 24 ч после дозирования	X	X	X
День 3	Через 48 ч после дозирования	X	X	X
Неделя 1		X	X	X
Неделя 2		X	X	X
Неделя 4		X	X	X
Неделя 6		X		
Неделя 8		X	X	X
Неделя 12		X	X	X
Неделя 20		X		
Неделя 34		X	X	X
Неделя 52		X		

58/67

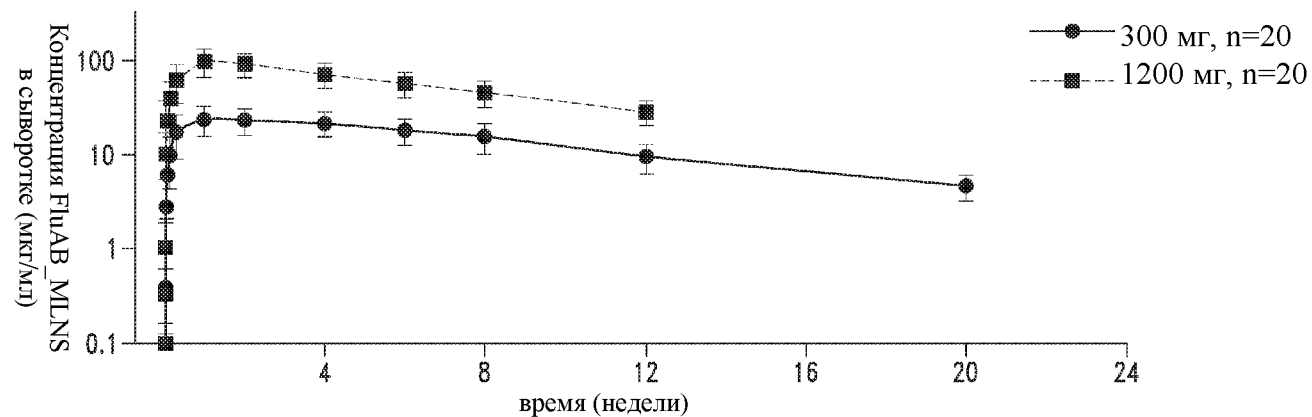
Фиг. 31

<u>Гематология</u> Общий анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты) с дифференцировкой (лимфоциты, моноциты, сегментированные нейтрофилы, эозинофилы, базофилы)	
<u>Химия</u> Альбумин Азот мочевины крови (BUN) Кальций Диоксид углерода бикарбонат кальция Креатинкиназа Креатинин	Клиренс креатинина Гамма-глутамилтрансфераза (GGT) Глюкоза Лактатдегидрогеназа Калий Натрий
<u>Анализ функции печени</u> Щелочная фосфатаза (ALP) Аланин-трансфераза (ALT)	Аспартатаминотрансфераза (AST) Билирубин (общий и прямой)
<u>Параметры свертывания крови (только при скрининге)</u> Международное нормализованное время (INR) Протромбиновое время (PT) Частичное тромбопластиновое время (PTT)	
<u>Анализ мочи</u> Билирубин Глюкоза Кетоны Лейкоциты Микроскопия (если показана с клинической точки зрения) Нитриты pH (тест-полоска)	Белки Эритроциты (RBC) Удельная плотность Уробилиноген Визуальный анализ внешнего вида и цвета Скрининг на злоупотребление наркотиками
<u>Тест на беременность (только WOCBP)</u> Бета-человеческий хорионный гонадотропин (сыворотка) Анализ мочи на беременность	
<u>Серология</u> Только при скрининге согласно части A HBV (HBsAg) HCV (антитело к HCV), если результат тестирования положительный HIV (скрининг)	

- Обитатели домов престарелых и других лечебных учреждений для хронических больных

Установленный диагноз:

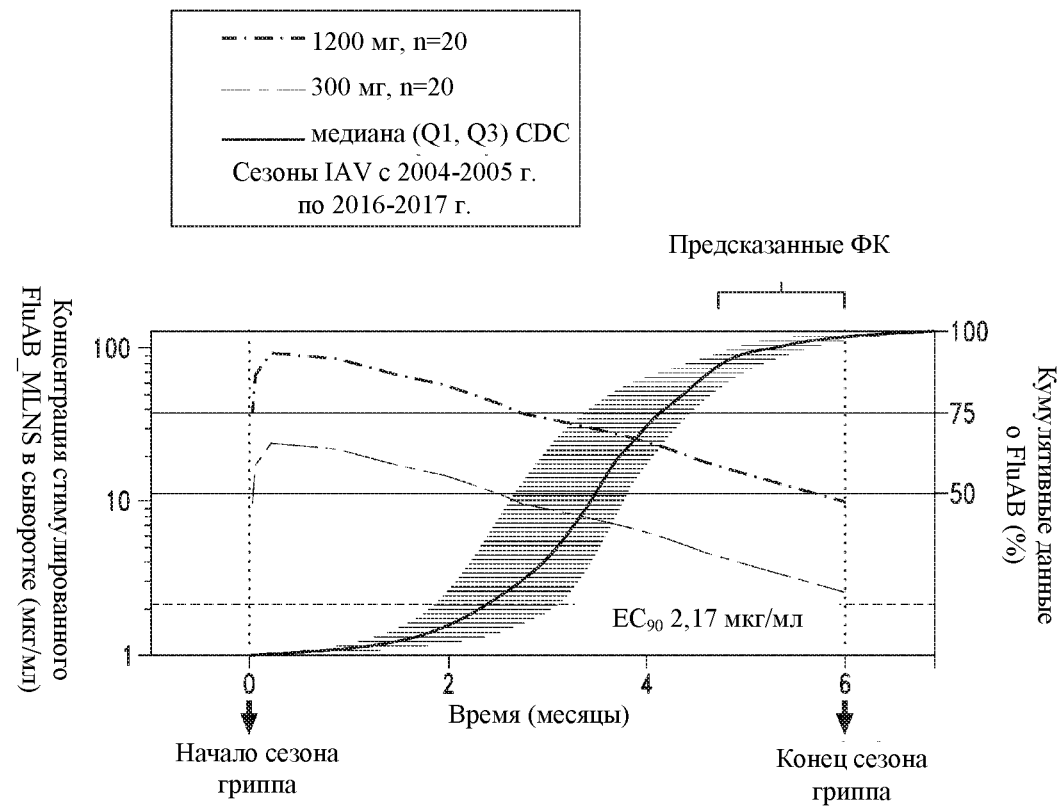
- Астма
- Неврологические состояния и нервно-психические состояния (такие как церебральный паралич, эпилепсия (судорожные расстройства), инсульт, умственная отсталость, задержка развития от умеренной до серьезной, мышечная дистрофия или травма спинного мозга)
- Хроническое заболевание легких (такое как хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), эмфизема и кистозный фиброз)
- Болезнь сердца (такая как врожденная болезнь сердца, застойная сердечная недостаточность и заболевание коронарной артерии)
- Заболевания крови (такое как серповидноклеточная анемия и талассемия)
- Нарушения эндокринной системы (такие как диабет и недостаточность надпочечников)
- Хроническое заболевание почек
- Хроническое заболевание печени
- Метаболические нарушения (такие как врожденные метаболические нарушения и митохондриальные нарушения)
- Ослабленная иммунная система вследствие заболевания или приема лекарственных средств (например, у индивидуумов с ВИЧ или СПИД, или раком, или постоянно принимающие стероиды)



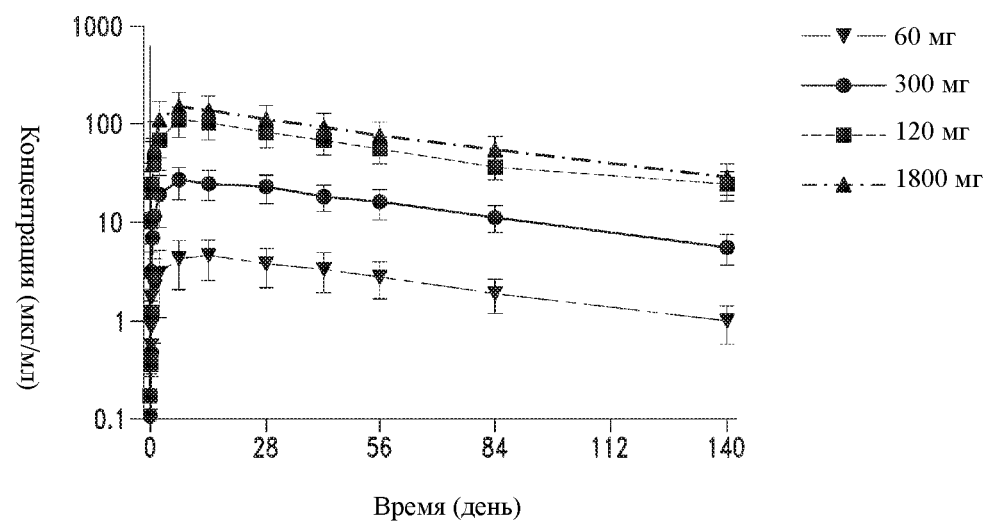
Доза, мг	C _{max} , мкг/мл	C _{max} /D мкг/мл/мг	T _{max} , день	AUC _{inf} , день*мкг/мл	AUC _{inf} /D день*мкг/мл/мг	CL/F, мл/день	V/F, л	T _{1/2} , день
300 (N=20)	24.6 (31.5)	0.08 (31.5)	7.0 (7.0, 14.0)	2260 (30.9)		149 (39.1)	10.6 (38.3)	50.3 (47.7, 51.3)
1200 (N=20)	98.9 (32.0)	0.08 (32.0)	7.0 (7.0, 8.8)					

Данные представлены в виде средних значений (%CV) за исключением T_{max} и t_{1/2}, которые представлены в виде медианных значений (Q1, Q3)

Фиг. 34



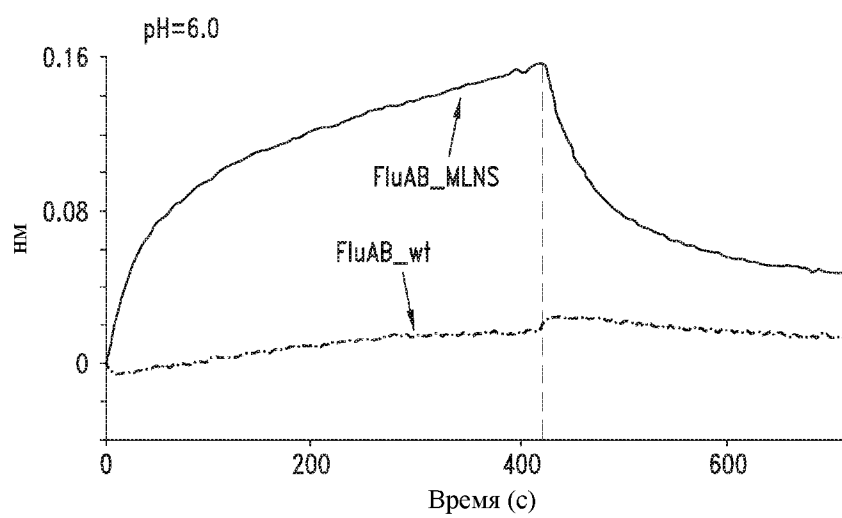
Фиг. 35



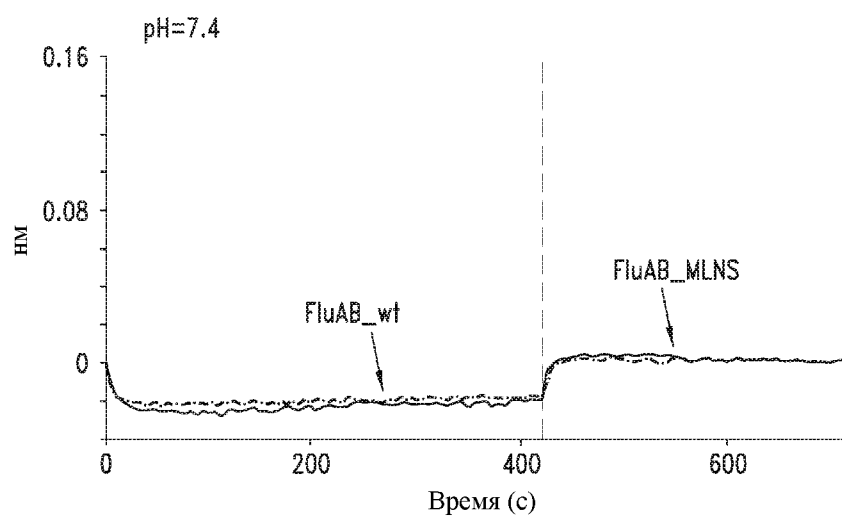
Фиг. 36

Параметр	доза (мг)			
	300 (N=20)	1200 (N=20)	1800 (N=20)	60 (N=20)
C_{max} , мг/мл	26.6 (35.2)	110 (32.9)	152 (38.4)	4.52 (45.4)
C_{max}/D , мг/мл/мг	0.088 (35.2)	0.091 (32.9)	0.084 (38.4)	0.075 (45.4)
T_{max} , день	7.0 (7.0, 14.0)	7.0 (7.0, 7.0)	7.0 (7.0, 14.0)	14 (7, 17.5)
C_{last} , мкг/мл	5.57 (33.7)	27.2 (54.2)	33.5 (71.5)	1.01 (53.1)
T_{last} , мг/мл	140	140	140	140
AUC_{last} , день*мг/мл	2010 (32.3)	7180 (32.7)	9930 (38.7)	343 (41.5)
AUC %, экстраполир.	18.8 (19.3)	21.4 (22.2)	19.3 (17.8)	19.0 (24.5)
AUC_{inf} , день*мг/мл	2470 (32.3)	9750 (30.0)	12700 (34.8)	455 (34.1)
AUC_{inf}/D , день*мг/мл/мг	8.24 (32.3)	8.12 (30.1)	7.05 (34.8)	7.59 (34.1)
CL/F, (мл/день)	137 (39.1)	134 (29.5)	164 (47.0)	157 (58.0)
V/F, л	11.1 (36.1)	11.7 (30.6)	14.1 (55.4)	12.8 (63.1)
$T_{1/2}$, день	58.7 (53.3, 61.4)	60.1 (56.7, 67.9)	57.8 (54.6, 63.4)	58.1 (49.6, 62.5)

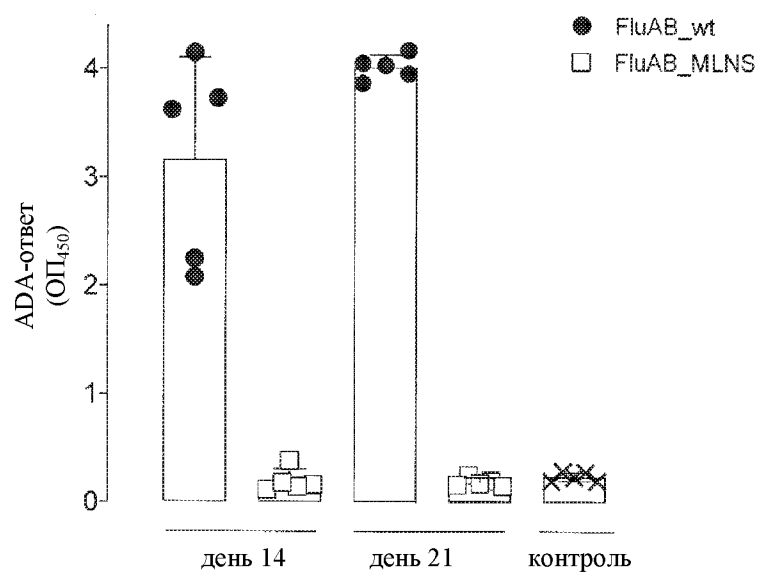
Фиг. 37



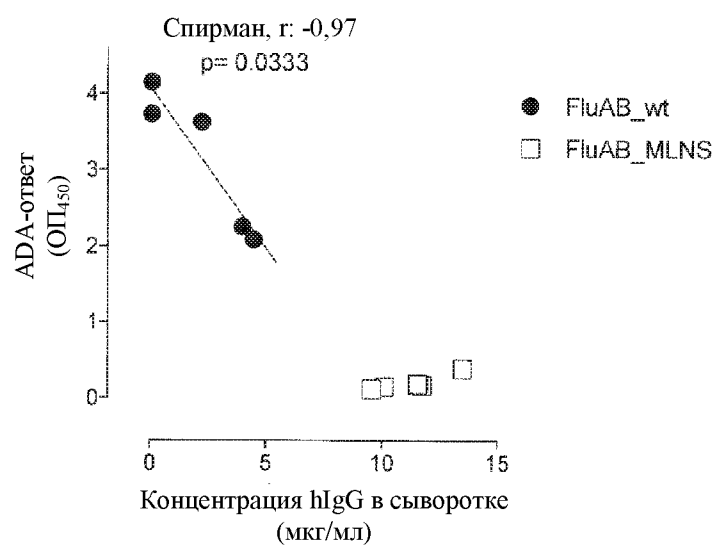
Фиг. 38А



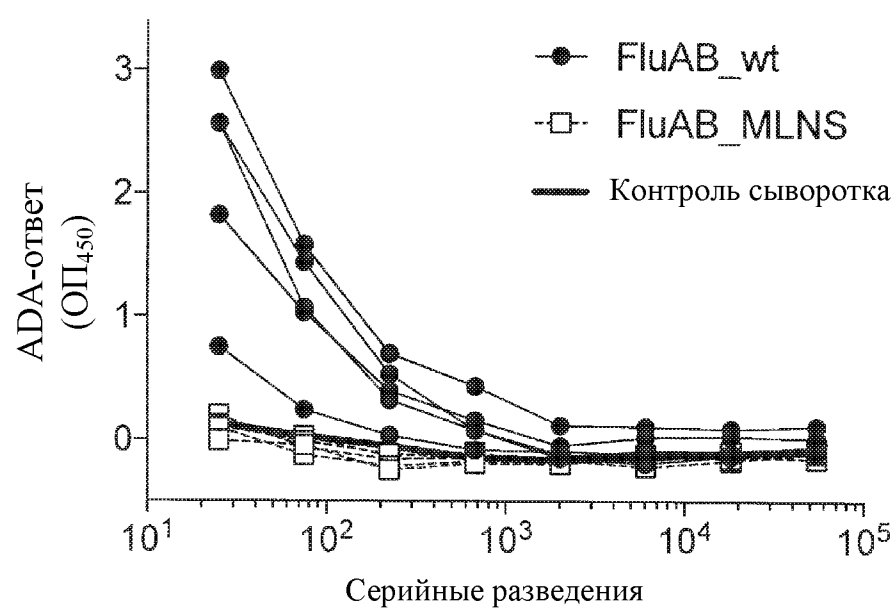
Фиг. 38Б



Фиг. 39А



Фиг. 39Б



Фиг. 40