

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291147** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.07.25

(22) Дата подачи заявки
2020.10.28

(51) Int. Cl. *C07K 16/10* (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/926,914; 63/094,170

(32) 2019.10.28; 2020.10.20

(33) US

(86) PCT/US2020/057635

(87) WO 2021/086899 2021.05.06

(71) Заявитель:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

Баум Алина, Киратсоус Кристос (US)

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(57) В данном документе предусмотрены моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с белком, представляющим собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа В, фармацевтические композиции, содержащие антитела, и способы применения. Антитела применимы для подавления или нейтрализации активности вируса гриппа В, обеспечивая таким образом средство для лечения или предупреждения инфекции, вызванной вирусом гриппа, у людей. Также предусмотрено применение одного или более антител, которые связываются с НА вируса гриппа В, для предупреждения прикрепления вируса и/или его проникновения в клетки-хозяева. Антитела можно применять с профилактической или терапевтической целью и их можно применять отдельно или в комбинации с одним или более другими противовирусными средствами или вакцинами.

A1

202291147

202291147

A1

АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИЦЕНЗИОННЫЕ ПРАВА ПРАВИТЕЛЬСТВА

[0001] Настоящее изобретение было создано при поддержке государства в рамках соглашения HNSO100201700020C, заключенного с Министерством здравоохранения и социальных служб США. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Официальная копия перечня последовательностей подается одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием «10625WO01_SEQ_LIST_ST25.txt», дата создания 28 октября 2020 года, и размером приблизительно 36 Кб. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки в его полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Грипп представляет собой очень заразное заболевание, которое имеет долгую историю, характеризующуюся пиками пандемий, эпидемий, повторных вспышек и рецидивов. Несмотря на ежегодные попытки вакцинации, инфекции, вызванные вирусом гриппа, приводят к значительной заболеваемости и смертности.

[0004] Вирусы гриппа делятся на четыре типа: А, В, С и D. Вирус гриппа В вызывает значительное число сезонных инфекций, вызванных вирусом гриппа, и может быть связан с тяжелым течением гриппа, требующим госпитализации.

[0005] Гемагглютинин представляет собой тримерный гликопротеин, который содержит два структурных домена: глобулярный головной домен, который состоит из рецептор-связывающего участка (который подвергается частому антигенному дрейфу), и стеблевой области (более консервативная среди различных штаммов вируса гриппа). Белок HA синтезируют в виде предшественника (HA0), который подвергается протеолитической обработке с получением двух субъединиц (HA1 и HA2), которые ассоциируются друг с другом с образованием структуры в виде стебля/глобулярной головки. Пептид HA1 отвечает за прикрепление вируса к

клеточной поверхности и (наряду с нейраминидазой) необходим для прикрепления вируса и его проникновения в клетку-хозяина. Пептид HA2 образует стержнеобразную структуру, которая опосредует слияние вирусных и клеточных мембран в эндосомах, обеспечивая высвобождение комплекса рибонуклеиновой кислоты в цитоплазму.

[0006] Новые штаммы вируса гриппа могут возникать в результате явления, называемого антигенным дрейфом, или мутаций в молекулах гемагглютинина или нейраминидазы, которые создают новые и различные эпитопы. Следствием этого является то, что новую вакцину необходимо получать каждый год против вирусов, которые, по прогнозам, появятся – способ который не только дорогостоящий, но и крайне неэффективный. Несмотря на то, что технологические разработки улучшили способность вырабатывать улучшенные антигены вируса гриппа для вакцинных композиций, остается потребность в обеспечении дополнительных источников защиты против гриппа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают HA вируса гриппа В. Антитела являются применимыми, *среди прочего*, для подавления или нейтрализации активности HA вируса гриппа В.

[0008] В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемагглютинином вируса гриппа В (HA).

[0009] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с HA вируса гриппа В, где антитело имеет одну или более из следующих характеристик:

(a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(b) связывается с HA вируса гриппа В с EC_{50} , составляющей менее чем приблизительно 10^{-10} M;

(c) демонстрирует увеличение выживаемости у животного, инфицированного вирусом гриппа; и/или

(d) содержит (i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

[00010] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, обеспечивают усиление защитной функции против вируса гриппа В у животного (например, млекопитающего) при подкожном или внутривенном введении и/или при введении до инфицирования или после инфицирования вирусом гриппа В.

[00011] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, могут облегчать тяжесть инфекции, вызванной вирусом гриппа В, у животного (например, млекопитающего), инфицированного вирусом гриппа В, при введении либо подкожно, либо внутривенно и/или при введении до инфицирования или после инфицирования вирусом гриппа В.

[00012] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают усиление защитной функции против вируса гриппа В при введении животному (например, млекопитающему), подвергнутому воздействию вируса гриппа В, в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг веса тела указанного млекопитающего, начиная с 1 дня, или 2 дней, или 3 дней, или 4 дней или 5 дней, или 6 дней, или 7 дней до инфицирования, например, по сравнению с пероральным введением противовирусного средства, такого как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир.

[00013] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, обеспечивают усиление защитной функции против вируса гриппа В у животного (например, млекопитающего) по сравнению с изотипическим (отрицательным) контрольным антителом, которое вводили сопоставимому животному (например, млекопитающему), при введении в виде однократной подкожной или внутривенной дозы, находящейся в диапазоне от 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг веса тела указанного животного, например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, или приблизительно 10 мг/кг, или приблизительно 12 мг/кг веса тела указанного животного.

[00014] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, обеспечивают усиление защитной функции против вируса гриппа В при введении животному (например, млекопитающему) в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг веса тела указанного животного, по сравнению с пероральным введением противовирусного средства, такого как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир. Например, противовирусное средство может представлять собой осельтамивир, вводимый два раза в сутки в течение 5 дней в дозе приблизительно 2 мг/кг.

[00015] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, обеспечивают уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, в популяции животных (например, млекопитающих), подвергшихся воздействию вируса гриппа В и инфицированных им, при введении в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг веса тела, за 24 часа до воздействия вируса гриппа В и инфицирования им.

[00016] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, обеспечивают уровень выживаемости 100% у животного (например,

млекопитающего), инфицированного вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг, за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней до воздействия вируса гриппа В и/или инфицирования им.

[00017] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют усиление защитной функции при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, начиная со дня 1, или дня 2, или дня 3 после инфицирования, например, по сравнению с пероральным введением противовирусного средства, такого как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир. Например, противовирусное средство может представлять собой осельтамивир, вводимый два раза в сутки в течение 5 дней в дозе приблизительно 2 мг/кг, начиная со дня 1, или дня 2, или дня 3 после инфицирования.

[00018] В связанном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, обеспечивают усиление защитной функции у животного (например, млекопитающего), инфицированного вирусом гриппа, при введении либо подкожно, либо внутривенно и/или при введении до инфицирования или после инфицирования вирусом гриппа.

[00019] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, демонстрируют усиление защитной функции по сравнению с животным, которому вводят антитело изотипического (отрицательного) контроля, при введении инфицированному млекопитающему в виде однократной подкожной или внутривенной дозы, находящейся в диапазоне от 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, или приблизительно 10 мг/кг, или приблизительно 12 мг/кг.

[00020] В некоторых вариантах осуществления антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, демонстрируют усиление защитной функции при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг, по сравнению с пероральным введением противовирусного средства, такого как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир. Например, противовирусное средство может представлять собой осельтамивир, вводимый два раза в сутки в течение 5 дней в дозе приблизительно 2 мг/кг.

[00021] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, демонстрируют уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, в популяции животных (например, млекопитающих), инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг веса тела животных, через 24 часа или дольше после инфицирования.

[00022] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, демонстрируют уровень выживаемости 100% в популяции животных (например, млекопитающих), инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 5 мг/кг, или приблизительно 10 мг/кг, или приблизительно 15 мг/кг веса тела животных, через 24, 48, 72 или 96 часов после инфицирования.

[00023] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, демонстрируют уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, в популяции животных (например, млекопитающих), инфицированных вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг веса тела животных, по

сравнению с 80% уровнем выживаемости, наблюдаемым в сопоставимой популяции животных, получающих противовирусное средство, такое как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир. Например, противовирусное средство может представлять собой осельтамивир, вводимый перорально два раза в сутки в течение 5 дней в дозе приблизительно 2 мг/кг. Уровень выживаемости, как описано в данном документе, можно измерять в фиксированной точке после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению (например, через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель или больше после введения).

[00024] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают дополнительный защитный эффект у животного (например, млекопитающего), инфицированного вирусом гриппа, при введении противовирусного средства, такого как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир. Например, противовирусное средство может представлять собой осельтамивир, вводимый более чем через 48 часов после инфицирования.

[00025] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают дополнительный защитный эффект у животного (например, млекопитающего), инфицированного вирусом гриппа, при введении противовирусного средства, такого как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир. Например, противовирусное средство может представлять собой осельтамивир, вводимый через 72 часа после инфицирования.

[00026] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают дополнительный защитный эффект в случае применения в комбинации с противовирусным средством, в случае если антитело вводят животному, инфицированному вирусом гриппа (например, млекопитающему), в виде

однократной внутривенной дозы, находящейся в диапазоне от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг веса тела животного, и при этом противовирусные средства, такие как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир, вводят перорально два раза в сутки в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг веса тела животного.

[00027] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают дополнительный защитный эффект в случае применения в комбинации с противовирусным средством, таким как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир, через 96 часов после инфицирования вирусом гриппа, где антитело вводят животному в виде однократной внутривенной дозы, находящейся в диапазоне от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг веса тела животного, и при этом противовирусные средства, например, осельтамивир, занамивир или пимодивир, вводят перорально два раза в сутки в течение 5 дней в дозе приблизительно 2 мг/кг веса тела животного.

[00028] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, можно вводить внутривенно, интраназально, подкожно, внутрикожно или внутримышечно, и при этом противовирусное средство можно вводить перорально или внутривенно.

[00029] В некоторых вариантах осуществления противовирусное средство вводят до введения антитела, предусмотренного в данном документе, параллельно с ним или после него.

[00030] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или противовирусные средства, такие как балоксавир, марбоксил, осельтамивир, занамивир или пимодивир, можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз.

[00031] Иллюстративное антитело к HA вируса гриппа В представлено в таблицах 1 и 2 данного документа. В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи (HCVR), переменной области легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность

областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) иллюстративного антитела к HA вируса гриппа В. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, HC и LC иллюстративного антитела к HA вируса гриппа В.

[00032] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с таблицей 1, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00033] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с HA вируса гриппа В, содержат аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2.

[00034] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с таблицей 1, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00035] В некоторых вариантах осуществления антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с НА вируса гриппа В, содержат аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10.

[00036] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с НА вируса гриппа В, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

[00037] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат

(a) домен HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4;

(b) домен HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6;

(c) домен HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8;

(d) домен LCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12;

(e) домен LCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14; и

(f) домен LCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

[00038] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают НА вируса гриппа В, содержат (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 4, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 6; (c) HCDR3 из SEQ ID NO: 8; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 12; (e) LCDR2 из SEQ ID NO: 14 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 16.

[00039] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают НА вируса гриппа В, содержат (a) HCDR3 под SEQ ID NO: 8 и (b) LCDR3 под SEQ ID NO: 16.

[00040] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00041] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00042] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00043] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1),

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00044] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00045] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00046] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), предусматривающих SEQ

ID NO: 8/16, или по сути аналогичных им последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ними.

[00047] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (*m. e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в пределах аминокислотной последовательности HCVR/LCVR иллюстративного антитела к HA вируса гриппа В, представленного в таблице 1. В определенных вариантах осуществления группа аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 предусматривает SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16.

[00048] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариабельности последовательности, определение согласно Chothia основано на местоположении структурных областей петли, и определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. *См., например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997) и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[00049] В данном документе также предусмотрены антитела и их

антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание HA вируса гриппа В с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью в соответствии с последовательностями HCVR и LCVR, представленными в таблице 1.

[00050] Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с HA вируса гриппа В или которые связывают тот же эпитоп на HA вируса гриппа В, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью в соответствии с последовательностями HCVR и LCVR, представленными в таблице 1.

[00051] Настоящее изобретение также предусматривает выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют присоединение к HA вируса гриппа В и/или его проникновение в клетку-хозяина.

[00052] В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими, предусматривающими первую специфичность связывания с первым эпитопом в HA вируса В и вторую специфичность связывания с другим антигеном.

[00053] Во втором аспекте в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот (например, молекулы ДНК или РНК), кодирующие антитела к HA вируса гриппа В или их части. Например, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности HCVR, представлены в таблице 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 1 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности LCVR, также представлены в таблице 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 9 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00054] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность HCDR1, приведенную в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты HCDR1, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00055] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность HCDR2, приведенную в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты HCDR2, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере

82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00056] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность HCDR3, приведенную в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты HCDR3, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00057] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность LCDR1, приведенную в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты LCDR1, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00058] Также в данном документе предусмотрены молекулы

нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность LCDR2, приведенную в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты LCDR2, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00059] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность LCDR3, приведенную в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты LCDR3, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[00060] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит группу из трех CDR (*m. e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), где группа аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является такой, как определено иллюстративным антителом к HA вируса гриппа, представленным в таблице 1.

[00061] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит группу из трех CDR (*m. e.* LCDR1-LCDR2-LCDR3), где группа аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-

LCDR3 является такой, как определено иллюстративным антителом к HA вируса гриппа, представленным в таблице 1.

[00062] Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность HCVR или LCVR, представленную в таблице 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR получены из одного и того же антитела к HA вируса гриппа В, представленного в таблице 1.

[00063] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и/или любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, представленных в таблице 1.

[00064] В связанном аспекте в данном документе предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи антитела к HA вируса гриппа В. Например, векторы могут включать рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, *т. е.* молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем

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

[00065] В третьем аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают НА вируса гриппа В, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте композиция может представлять собой комбинацию антитела к НА вируса гриппа В и второго терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при комбинировании которого с антителом к НА вируса гриппа В обеспечивается преимущество. Иллюстративные средства, которые можно комбинировать с антителом к НА вируса гриппа В с обеспечением преимущества, включают без ограничения другие средства, которые связывают и/или подавляют активность НА вируса гриппа (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, такие как антитело, которое связывает и/или подавляет НА вируса гриппа, и т. д.), и/или средства, которые непосредственно не связывают НА вируса гриппа, однако, тем не менее, подавляют вирусную активность, в том числе способность инфицировать клетки-хозяева. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (а) первое антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело связывается с первым эпитопом на НА вируса гриппа В, и второе антитело связывается со вторым эпитопом на НА вируса гриппа В, где первый и второй эпитопы отличаются и не перекрываются; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (а) первое антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело не конкурирует перекрестно со вторым антителом за связывание с НА вируса гриппа В; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах

осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) первое антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с другим антигеном вируса гриппа, где первое антитело связывается с эпитопом на НА вируса гриппа В, и второе антитело связывается с эпитопом на другом антигене вируса гриппа; и (c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) первое антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с другим вирусным (не принадлежащим к вирусу гриппа) антигеном, где первое антитело связывается с эпитопом на НА вируса гриппа В, и второе антитело связывается с эпитопом на другом вирусном (не принадлежащем к вирусу гриппа) антигене; и (c) фармацевтически приемлемые носитель или разбавитель. Дополнительные комбинированные терапевтические препараты и комбинированные составы, включающие антитела к НА вируса гриппа В, предусмотренные в данном документе, раскрыты в других частях данного документа. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) антитело к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент и (б) антитело к НА вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00066] В четвертом аспекте в данном документе предусмотрены терапевтические способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с НА вируса гриппа В (такого как вирусная инфекция у субъекта), или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с вирусной инфекцией, с использованием антитела к НА вируса гриппа В или антигенсвязывающей части антитела, предусмотренного в данном документе, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, субъекту, нуждающемуся в этом. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, по отношению к которому обеспечивают улучшение течения, уменьшение интенсивности, подавление или предупреждение путем подавления активности НА вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления

настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа В, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к НА вируса гриппа или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом.

[00067] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы уменьшения интенсивности, снижения выраженности или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у субъекта посредством введения антитела к НА вируса гриппа В, предусмотренного в данном документе, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительных болей, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и летального исхода.

[00068] В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы снижения вирусной нагрузки у субъекта, при этом способы включают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента, которое связывает НА вируса гриппа В и блокирует связывание и/или проникновение вируса гриппа в клетку-хозяина.

[00069] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту, у которого имеется инфекция, вызванная вирусом гриппа, или риск ее возникновения, или предрасположенность к ее развитию. Субъекты, подверженные риску, включают без ограничения человека с ослабленным иммунитетом, например, человека с ослабленным иммунитетом вследствие аутоиммунного заболевания, или людей, получающих иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органов), или людей, пораженных синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), с определенными формами анемии, которые истощают или разрушают белые кровяные тельца, тех людей, которые получают лучевую или химиотерапию, или тех людей, которые страдают воспалительным нарушением. Другие субъекты,

подверженные риску приобретения инфекции, вызванной вирусом гриппа, включают взрослых людей пожилого возраста (в возрасте 65 лет или старше), детей в возрасте младше 2 лет, работников сферы здравоохранения и людей с основными патологическими состояниями, такими как легочная инфекция, заболевание сердца или диабет. Также любой человек, который вступает в физический контакт с инфицированным человеком или физически расположен вблизи него, имеет повышенный риск развития инфекции, вызванной вирусом гриппа. Кроме того, субъект подвержен риску заражения инфекцией, вызванной вирусом гриппа, ввиду близости к вспышке заболевания, например, субъект находится в городе с высокой плотностью населения или в непосредственной близости от субъектов, у которых имеются подтвержденные или предполагаемые инфекции, вызванные вирусом гриппа, или выбора места работы, например, работник больницы, фармацевтический исследователь, путешественник в инфицированную область или пассажир, часто совершающий полеты.

[00070] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные средства), противоинфекционного лекарственного средства, другого антитела к НА вируса гриппа (например, антитела к НА вируса гриппа А), антитела к другому антигену вируса гриппа (например, нейраминидазе), противовирусного лекарственного средства, деконгестанта, антигистамина, вакцины против вируса гриппа, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, и любого другого лекарственного средства или терапевтического препарата, известных из уровня техники, применимых для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, или для снижения вирусной нагрузки у пациента. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое способствует противодействию или снижению любого(-ых) возможного(-ых) побочного(-ых) эффекта(-ов), ассоциированного(-ых) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предусмотренными данным документом,

если такой(-ие) побочный(-ые) эффект(-ы) будет(-ут) возникать. Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутривентриально, перорально, интраназально, внутримышечно или интракраниально. В некоторых вариантах осуществления антитело можно вводить посредством одной внутривенной инфузии для достижения максимальной концентрации антитела в сыворотке крови субъекта. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг веса тела до приблизительно 100 мг/кг веса тела субъекта. В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело можно вводить в одной или более дозах, составляющих от 50 до 5000 мг.

[00071] В пятом аспекте в данном документе предусмотрены выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) вируса гриппа В, где антитело имеет одну или более из следующих характеристик: (а) связывается с НА вируса гриппа В с EC_{50} , составляющей менее чем приблизительно 10^{-9} М; (b) демонстрирует увеличение выживаемости у животного, инфицированного вирусом гриппа В, после введения указанному животному, инфицированному вирусом гриппа В, по сравнению с сопоставимым животным, инфицированным вирусом гриппа В, по отношению к которому указанное введение не осуществлялось; и/или (с) содержит (i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с HCVR, представленной под SEQ ID NO: 2; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с LCVR, представленной под SEQ ID NO: 10.

[00072] В некоторых вариантах осуществления при введении с профилактической целью млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 5 мг/кг веса тела млекопитающего или приблизительно 0,5 мг/кг, выделенное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент обеспечивают защиту млекопитающего от инфекции при последующем воздействии вируса гриппа В. В некоторых вариантах осуществления при введении с профилактической целью млекопитающему до воздействия вируса гриппа В выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают снижение риска инфекции, вызванной вирусом гриппа, у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления при введении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента млекопитающему выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают уменьшение интенсивности, снижение выраженности или уменьшение тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительных болей, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и летального исхода.

[00073] В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 80%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 90%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после

введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 80%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 90%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления уровень выживаемости наблюдается через 13 дней после введения.

[00074] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше, содержащие HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.

[00075] В шестом аспекте в данном документе предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие (a) домен HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; (b) домен HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; (c) домен HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; (d) домен LCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; (e) домен LCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14; и (f)

домен LCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

[00076] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с гемагглютинином (НА) вируса гриппа В. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с профилактической целью млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 5 мг/кг веса тела млекопитающего или приблизительно 0,5 мг/кг, обеспечивается защита млекопитающего от инфекции при последующем воздействии вируса гриппа В. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с профилактической целью млекопитающему до воздействия вируса гриппа В у млекопитающего снижается риск инфекции, вызванной вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления при введении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента млекопитающему указанные выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают уменьшение интенсивности, снижение выраженности или уменьшение тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительных болей, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и летального исхода.

[00077] В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 80%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в

указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 90%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 80%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 90%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления при введении выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления уровень выживаемости наблюдается через 13 дней после введения.

[00078] В некоторых вариантах осуществления вышеописанные выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представлены антителом изотипа IgG1. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представлены антителом изотипа IgG4. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представлены биспецифическим антителом.

[00079] В седьмом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая вышеописанные выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[00080] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит второе терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела, которое специфически связывается с НА вируса гриппа, вакцины против вируса гриппа, пищевой добавки и другого средства паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления пищевая добавка представляет собой антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления противовирусное лекарственное средство представляет собой осельтамивир. В некоторых вариантах осуществления противовирусное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против вируса гриппа А. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство против вируса гриппа А представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с НА вируса гриппа А.

[00081] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулу полинуклеотида, содержащую полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR или LCVR антитела, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий данный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую указанный вектор.

[00082] В восьмом аспекте в данном документе предусмотрен способ предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у субъекта, инфицированного вирусом гриппа, при этом способ включает введение указанному субъекту вышеописанных антитела или антигенсвязывающего фрагмента или вышеописанной фармацевтической композиции.

[00083] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, кашля, болей в теле, ринореи, одышки, пневмонии и бронхита. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят указанному субъекту с профилактической целью. В некоторых вариантах осуществления субъект выбран из группы, состоящей из индивидуума с ослабленным иммунитетом, взрослого в возрасте 65 лет или старше, работника сферы здравоохранения и человека с наличием проблем медицинского характера в анамнезе или основного патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления основное патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из проблемы со стороны сердца и диабета. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела, которое специфически связывается с НА вируса гриппа, вакцины против вируса гриппа, пищевой добавки и другого средства паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления пищевая добавка представляет собой антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство вводят посредством пути введения, являющегося отличным

от такового для указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления противовирусное лекарственное средство представляет собой осельтамивир. В некоторых вариантах осуществления осельтамивир вводят до введения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления осельтамивир вводят параллельно с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления осельтамивир вводят после введения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления противовирусное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против вируса гриппа А. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство против вируса гриппа А представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с НА вируса гриппа А. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутримышечно, интраназально или перорально.

[00084] Настоящее изобретение также включает применение антитела к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения заболевания или нарушения, при которых блокирование связывания и/или активности НА вируса гриппа могло бы принести пользу. Настоящее изобретение также включает применение антитела к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающего фрагмента в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, при которых блокирование связывания и/или активности НА вируса гриппа могло бы принести пользу.

[00085] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00086] Перед описанием способов настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут

варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[00087] Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00088] Настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают НА вируса гриппа В. Антитела являются применимыми, *среди прочего*, для подавления или нейтрализации активности НА вируса гриппа В.

[00089] Антитела, предусмотренные в данном документе, могут быть полноразмерными (например, полноразмерное антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент), при этом их можно модифицировать с целью воздействия на функциональность, например, для увеличения стабильности в хозяине, или для повышения эффекторной функции, или устранения остаточных эффекторных функций (Reddy *et al.*, 2000, J. Immunol. 164:1925-1933) относительно немодифицированного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть биспецифическим.

[00090] В некоторых вариантах осуществления антитела применимы для блокирования прикрепления вируса гриппа к клетке-хозяину и/или для предупреждения проникновения вируса гриппа в клетки-хозяева. В некоторых вариантах осуществления функция антител проявляется в подавлении передачи вируса между клетками. В определенных вариантах осуществления антитела

являются применимыми в предупреждении, лечении или уменьшении интенсивности по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитела можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту, имеющему инфекцию, вызванную вирусом гриппа, или подверженную ее возникновению. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело, предусмотренное в данном документе, можно вводить субъекту, которому вакцина противопоказана, или для которого вакцина является менее эффективной, например, пожилому пациенту, очень молодому пациенту, пациенту, у которого может иметься аллергия на один или более компонентов вакцины, или пациенту с ослабленным иммунитетом, у которого может не развиваться ответ на иммуногены в вакцине. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело, предусмотренное в данном документе, можно вводить медицинскому персоналу, госпитализированным пациентам или лицам, проживающим в доме престарелых, или другим пациентам с факторами высокого риска во время вспышки гриппа. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело, предусмотренное в данном документе, можно вводить пациентам в качестве средства лечения первой линии, в случае если прогнозируемая ежегодная вакцина неэффективна, или в случае пандемии со штаммом, который подвергся серьезному антигенному дрейфу.

Определения

[00091] Термин «гемагглютинин вируса гриппа», также называемый «НА вируса гриппа», обозначает трехмерный гликопротеин, находящийся на поверхности вирионов гриппа, который опосредует присоединение вируса (посредством связывания НА1 с α -2,3- или α -2,6-сиаловыми кислотами) и проникновение (посредством конформационного изменения) в клетки-хозяева. НА состоит из двух структурных доменов: глобулярного головного домена, содержащего рецептор-связывающий участок (подвержен высокой частоте антигенных мутаций), и стеблевой области (более консервативная среди различных штаммов вируса гриппа). НА вируса гриппа синтезируется в виде предшественника (НА0), который подвергается протеолитической обработке с получением двух субъединиц (НА1 и

HA2), которые ассоциируются друг с другом с образованием структуры в виде стебля/глобулярной головки. Вирусный HA является наиболее вариабельным антигеном на вирусе (18 подтипов можно разделить на две группы), но стебель (HA2) является высококонсервативным в каждой группе. Примером аминокислотной последовательности полноразмерного HA вируса гриппа В является HA из B/Victoria/2/87, SEQ ID NO: 21 (номер доступа в GenBank AAA43697.1), HA из B/Nanchang/3451/93, SEQ ID NO: 22 (частичная последовательность; номер доступа в GenBank AAD02807.1), HA из B/Singapore/11/1994, SEQ ID NO: 23 (номер доступа в GenBank ABN50712.1) и HA из B/Florida/4/2006, SEQ ID NO: 24 (номер доступа в GenBank ACA33493.1). Термин «HA вируса гриппа» также включает варианты белков HA вируса гриппа, выделенные из других изолятов вируса гриппа В, а также из изолятов вируса гриппа А. Термин «HA вируса гриппа» также включает рекомбинантный HA или его фрагмент. Термин также охватывает HA вируса гриппа или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью.

[00092] Термин «инфекция вирусом гриппа», используемый в данном документе, также характеризуемый как «грипп», относится к тяжелому острому респираторному заболеванию, вызванному вирусом гриппа. Термин включает инфекцию дыхательных путей и симптомы, которые включают лихорадку, головную боль, общие боли и боли, усталость и слабость, в некоторых случаях сильное истощение, заложенность носа, чихание, боль в горле, дискомфорт в груди, кашель, одышку, бронхит, пневмония и смерть в тяжелых случаях.

[00093] Термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому феномену, который делает возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[00094] Биослойная интерференция представляет собой безметочную технологию для измерения биомолекулярных взаимодействий. Это оптическая аналитическая методика, которая анализирует схему интерференции белого света, отраженного от двух поверхностей: слоя иммобилизованного белка на кончике

биодатчика и внутреннего эталонного слоя. Любое изменение количества молекул, связанных с наконечником биосенсора, вызывает сдвиг схемы интерференции, которая может быть измерена в реальном времени (Abdiche, Y.N., *et al.* Analytical Biochemistry, (2008), 377(2), 209-217). В определенных вариантах осуществления для оценки характеристик связывания определенных антител к НА вируса гриппа применяли «биодатчик (анализ Octet HTX) на основе биослойной интерферометрии в реальном времени».

[00095] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными участками на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к участку на антигене, в отношении которого у В- и/или Т-клеток развивается ответ. Он также относится к области антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы можно определять как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в общем представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно обуславливают свойство аффинности взаимодействия. Также эпитопы могут быть конформационными, т. е. состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические характеристики трехмерных структур и/или специфические характеристики заряда.

[00096] Термин «перекрестно конкурирует», используемый в данном документе, означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном и подавляют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию двух антител в обоих направлениях, *т. е.*, первое антитело, которое связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах

осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с разными, но не перекрывающимися эпитопами таким образом, что связывание одного подавляет или блокирует связывание второго антитела, *например, посредством стерического несоответствия*. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью известных из уровня техники способов, например, с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии. Для определения того, конкурирует ли перекрестно тестируемое антитело с эталонным антителом к вирусу гриппа В, эталонному антителу дают возможность связываться с НА или пептидом вируса гриппа в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с НА вируса гриппа. Если тестируемое антитело способно связываться с НА вируса гриппа после насыщения связывания с помощью эталонного антитела к НА вируса гриппа, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к НА вируса гриппа. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с НА вируса гриппа после насыщения связывания с помощью эталонного антитела к НА вируса гриппа, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом к НА вируса гриппа.

[00097] Фраза «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое приводит к требуемому эффекту, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[00098] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, например, млекопитающему, такому как человек, нуждающемуся в уменьшении интенсивности, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Субъект может иметь инфекцию, вызванную вирусом гриппа, или он может быть предрасположен к развитию инфекции, вызванной вирусом гриппа. Субъекты, «предрасположенные к развитию инфекции, вызванной вирусом гриппа», или пациенты, «которые могут находиться

под повышенным риском заражения инфекцией, вызванной вирусом гриппа», являются субъектами с ослабленной иммунной системой вследствие аутоиммунного заболевания, теми людьми, которые получают иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органов), теми людьми, которые поражены синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), с определенными формами анемии, которые истощают или разрушают белые кровяные тельца, теми людьми, которые получают лучевую или химиотерапию, или теми людьми, которые страдают воспалительным нарушением. Кроме того, под повышенным риском находится субъект чрезвычайно молодого или старшего возраста. Любой человек, который вступает в физический контакт с инфицированным человеком или физически расположен вблизи него, имеет повышенный риск развития инфекции, вызванной вирусом гриппа. Кроме того, субъект подвержен риску заражения инфекцией, вызванной вирусом гриппа, ввиду близости к вспышке заболевания, например, субъект находится в городе с высокой плотностью населения или в непосредственной близости от субъектов, у которых имеются подтвержденные или предполагаемые инфекции, вызванные вирусом гриппа, или выбора места работы, например, работник больницы, фармацевтический исследователь, путешественник в инфицированную область или пассажир, часто совершающий полеты.

[00099] Используемые в данном документе термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» относятся к снижению или уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфекции, вызванной вирусом гриппа, вследствие введения терапевтического средства, такого как антитело, раскрытое в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. Термины включают подавление прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т. е. у субъекта может отсутствовать инфекция или у него могут быть снижены или отсутствовать вирусные титры при введении терапевтического средства, такого как антитело, описанное в данном документе. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

[000100] Термины «предупреждать», «предупреждающий» или

«предупреждение» относятся к подавлению проявления инфекции, вызванной вирусом гриппа, или любых симптомов или признаков инфекции вирусом гриппа при введении антитела, раскрытого в данном документе. Термин включает предупреждение распространения инфекции у субъекта, который подвергнулся воздействию вируса или подверженного риску возникновения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

[000101] Как используется в данном документе, «защитный эффект» может быть продемонстрирован с помощью любой стандартной процедуры, известной из уровня техники для определения того, может ли средство, такое как противовирусное средство, или антитело, такое как антитело к НА вируса гриппа, раскрытое в данном документе, обеспечивать любое одно или более из, *например*, повышения выживаемости в популяции субъектов после воздействия инфекционного агента (по сравнению с сопоставимой популяцией субъектов, которые не получали лечения и также подверглись воздействию инфекционного агента), снижения вирусной нагрузки (по отношению к субъекту до лечения) или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, связанного с инфекционным агентом (по сравнению с субъектом до лечения).

[000102] Используемый в данном документе термин «противовирусное лекарственное средство» относится к любому противомикробному лекарственному средству или терапевтическому препарату, применяемым для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности вирусной инфекции у субъекта. Термин «противовирусное лекарственное средство» включает без ограничения TAMIFLU® (осельтамивир), RELENZA® (занамивир), балоксавир, марбоксил, рибавирин или интерферон-альфа2b. «Противовирусное лекарственное средство» также включает противовирусные антитела. Например, противовирусное лекарственное средство может представлять собой антитело, используемое для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности инфекции, вызванной вирусом гриппа (например, гриппа А, гриппа В или обоих). Такое антитело может нацеливаться на гемагглютинин гриппа А, гриппа В или обоих. В настоящем изобретении подлежащая лечению инфекция вызывается вирусом гриппа.

Общее описание

[000103] Грипп представляет собой инфекционное заболевание, вызванное РНК-вирусами семейства Orthomyxoviridae (вирусы гриппа). Вирусы гриппа классифицируют на основе корового белка на четыре типа – А, В, С и D, которые дополнительно подразделяются на подтипы, определяемые вирусными оболочечными гликопротеинами гемагглютинином (HA) и нейраминидазой (NA). Вирусы гриппа В сформировали гомогенную группу, которая начала расходиться на две антигенно различимые линии в 1970-х годах: В/Victoria/2/87 и В/Yamagata/16/88, известные сегодня как линии Victoria и Yamagata. Вирус гриппа А инфицирует ряд видов млекопитающих и птиц, тогда как инфекции В и С в значительной степени ограничены людьми. Вирус гриппа D в первую очередь поражает крупный рогатый скот, но не людей. Заболевание у человека вызывают только типы А и В.

[000104] Высокие скорости мутаций и частые генетические различия в вирусах гриппа способствуют высокой вариабельности антигенов HA и NA. Мелкие мутации, вызывающие небольшие изменения («антигенный дрейф»), возникают относительно часто. Антигенный дрейф дает возможность вирусу избежать иммунного распознавания, что приводит к повторяющимся вспышкам гриппа во время межпандемных лет. Значительные изменения в антигене HA («антигенный дрейф») обусловлены реассортацией генетического материала от разных подтипов вируса гриппа. Антигенные дрейфы, обусловленные новыми пандемическими штаммами, представляют собой редкие явления, происходящие посредством реассортации между подтипами животными и человеческими подтипами, например у свиней с сочетанной инфекцией.

[000105] HA синтезируется в виде гомо-тримерного предшественника HA0. Каждый мономер можно независимо расщеплять посттрансляционно с образованием двух полипептидов HA1 и HA2, связанных единственной дисульфидной связью. Более крупный N-концевой фрагмент (аминокислоты HA1 320-330) образует мембранно-дистальный глобулярный домен, который содержит рецептор-связывающий участок и большинство детерминант, распознаваемых вирус-нейтрализующими антителами. Полипептид HA1 HA отвечает за прикрепление вируса к клеточной поверхности. Меньшая C-концевая часть (HA2, приблизительно 180 аминокислот) образует стержнеобразную структуру, которая прикрепляет

глобулярный домен к клеточной или вирусной мембране. Полипептид HA2 опосредует слияние вирусных и клеточных мембран в эндосомах, обеспечивая высвобождение комплекса рибонуклеиновой кислоты в цитоплазму.

[000106] Несмотря на десятилетия исследований, отсутствуют доступные на рынке антитела, которые в значительной степени нейтрализуют или подавляют инфекцию, вызванную вирусом гриппа В, или ослабляют заболевание, вызванное вирусом гриппа В. Таким образом, существует необходимость в идентификации новых антител, которые нейтрализуют несколько подтипов вируса гриппа В, и их можно применять в качестве лекарственных препаратов для предупреждения или терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа В.

[000107] Пассивную иммунотерапию для профилактики или лечения инфекционных заболеваний использовали в течение более чем столетия, как правило, в форме конвалесцентной человеческой сыворотки, которая содержит высокие титры нейтрализующих антител (Good *et al.* 1991; Cancer 68: 1415-1421). В настоящее время множество очищенных моноклональных антител проходят доклинические и клинические исследования для применения в качестве противомикробных средств (Marasco *et al.* 2007; Nature Biotechnology 25: 1421-1434).

[000108] Авторы настоящего изобретения описали в данном документе полностью человеческие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемагглютинином вируса гриппа и модулируют взаимодействие вируса гриппа с клетками-хозяевами. Антитела к HA вируса гриппа В могут связываться с HA вируса гриппа В с высокой аффинностью. В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, являются блокирующими антителами, где антитела могут связываться с HA вируса гриппа и блокировать прикрепление вируса к клетке-хозяину и/или его проникновение в нее. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела могут блокировать связывание вируса гриппа с клетками и таким образом могут подавлять или нейтрализовать вирусную способность инфицировать клетки-хозяева В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела могут быть применимы для лечения субъекта, страдающего от инфекции, вызванной вирусом гриппа. При введении нуждающемуся в этом субъекту антитела могут уменьшать у субъекта

инфицирование вирусом, таким как грипп. Их можно использовать для уменьшения вирусных нагрузок у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение. Их можно применять отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими молекулами или способами воздействия, известными из уровня техники, для лечения вирусной инфекции. В определенных вариантах осуществления эти антитела могут связываться с эпитопом в стеблевой области вирусного НА. Кроме того, идентифицированные антитела можно применять с профилактической целью (до инфицирования) для защиты животного (например, млекопитающего) от инфекции или можно применять с терапевтической целью (после развития инфекции) для уменьшения интенсивности ранее развившейся инфекции или для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией.

[000109] Полноразмерные аминокислотные последовательности иллюстративных НА вируса гриппа В показаны в GenBank под номером доступа AAA43697.1 (из B/Victoria/2/87, см. также SEQ ID NO: 21), номером доступа AAD02807.1 (частичная последовательность из B/Nanchang/3451/93, см. также SEQ ID NO: 22), номером доступа ABN50712.1 (из B/Singapore/11/1994, см. также SEQ ID NO: 23) и номером доступа ACA33493.1 (из B/Florida/4/2006, см. также SEQ ID NO: 24).

[000110] В определенных вариантах осуществления антитела получены от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный НА вируса гриппа В, или рекомбинантной формой НА вируса гриппа В или их фрагментами с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенетически активным фрагментом НА вируса гриппа В. В определенных вариантах осуществления антитела получены от мышей, иммунизированных композицией на основе вакцины против вируса гриппа с последующей бустерной иммунизацией одним или более рекомбинантно полученными пептидами НА. Например, антитело можно получить путем иммунизации мышей с помощью B/Victoria/2/87, затем с помощью B/Yamagata/16/88, а затем снова с помощью B/Victoria/2/87; или путем иммунизации мышей с помощью B/Yamagata/16/88, затем с помощью B/Victoria/2/87, а затем снова с помощью B/Yamagata/16/88. В некоторых аспектах штамм B/Yamagata может быть заменен штаммом B/Maryland/03/2008, или

B/Florida/4/2006, или B/Nanchang/3451/93, или B/Singapore/11/1994. Мышей можно стимулировать смесью ДНК, кодирующих НА из B/Victoria/2/87, B/Yamagata/16/88, B/Maryland/03/2008, B/Nanchang/3451/93, B/Singapore/11/1994 и/или B/Florida/4/2006, например, смесью 1:1 ДНК, кодирующих НА из B/Victoria/2/87 и B/Yamagata/16/88.

[000111] Иммуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент НА вируса гриппа В или ДНК, кодирующую его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из стеблевой области белка НА.

[000112] Эти пептиды можно модифицировать для добавления или замены определенных остатков для введения метки или в целях конъюгирования с молекулами носителя, такого как KLH. Например, цистеин можно добавлять либо по N-концу, либо по C-концу пептида, или можно добавлять линкерную последовательность с целью получения пептида для конъюгирования, например, KLH для иммунизации.

[000113] Определенные антитела к НА вируса гриппа, раскрытые в данном документе, способны связываться и нейтрализовать активность НА вируса гриппа В, что определяется анализами *in vitro* или *in vivo*. Способность антител связываться с НА вируса гриппа В и нейтрализовывать его активность и тем самым прикрепление и/или проникновение вируса в клетку-хозяина с последующей вирусной инфекцией может быть измерена с применением любого стандартного способа, известного специалистам в данной области, включая анализы связывания или анализы активности, как описано в данном документе.

[000114] Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания известны специалисту в данной области. Например, аффинность связывания и константы диссоциации антител к НА вируса гриппа В для НА вируса гриппа В можно определять посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore. Анализы нейтрализации можно использовать для определения способности инфицирования у различных штаммов вируса гриппа В. Антитела к НА вируса гриппа В могут опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или могут опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC)

инфицированных вирусом клеток *in vitro*. Иллюстративные антитела способны нейтрализовать инфекцию, вызванную вирусом гриппа В, *in vivo*.

[000115] Антитела, специфичные к НА вируса гриппа В, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности. В некоторых вариантах осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, выявляемую с помощью МРТ. В определенных вариантах осуществления такие меченые антитела можно использовать в диагностических исследованиях, в том числе в диагностических исследованиях с визуализацией.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител

Антитела

[000116] Термин «антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (*m. e.* «молекул полного антитела»), а также их мультимеров (*например*, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящего из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в

следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе параллельного сравнения двух или более CDR.

[000117] Предусматривается, что используемый в данном документе термин «человеческое антитело» включает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Моноклональные человеческие антитела могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (*например*, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, не предназначен для включения моноклональных антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего (*например*, мыши), привиты на человеческие последовательности FR. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у млекопитающего, не относящегося к человеку, или в клетках млекопитающего, не относящегося к человеку. Термин не подразумевает включение антител, выделенных из человека-субъекта или полученных от него.

[000118] Термин «рекомбинантный», используемый в данном документе, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые созданы, экспрессированы, выделены или получены с помощью технологий или способов, известных из уровня техники, как например, технология рекомбинантной ДНК, которая включает, *например*, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не относящегося к человеку (в том числе у трансгенных млекопитающих, не относящихся к человеку, *например*, трансгенных мышей), или в клеточной системе экспрессии (*например*, клетках CHO), или они выделены из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

[000119] Термин «специфически связывает» или «специфически связывается с» или ему подобный означает, что антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать с помощью равновесной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (*например*, меньшее значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны из уровня техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т. п. Как описано в данном документе, антитела были идентифицированы с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии на биосенсоре Octet® НТХ, который специфически связывается с НА вируса гриппа. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в НА вируса гриппа и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями НА вируса гриппа, тем не менее, считаются антителами, которые «специфически связываются», как используется в данном документе.

[000120] Термин «высокоаффинное» антитело относится к тем моноклональным антителам, которые характеризуются аффинностью связывания с НА вируса гриппа, выраженной в виде K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М; по меньшей мере приблизительно 10^{-9} М; по меньшей мере приблизительно 10^{-10} М или по меньшей мере приблизительно 10^{-11} М, как измерено с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии, например, посредством биосенсора Octet® НТХ, или с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например* посредством BIACORE™, или с помощью определения аффинности в растворе посредством ELISA.

[000121] Под терминами «медленная скорость диссоциации», « K_{off} » или « k_d » подразумевается антитело, которое диссоциирует из комплекса с НА вируса гриппа с константой скорости $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или меньше или $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или меньше, как определено посредством анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии, например посредством биодатчика Octet® НТХ, или поверхностного плазмонного резонанса, *например* посредством BIACORE™.

[000122] Используемый в данном документе термин « K_D » предназначен

для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[000123] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемые в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с НА вируса гриппа.

[000124] В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител, предусмотренные в данном документе, могут быть конъюгированы с функциональной молекулой, такой как лиганд, или терапевтической молекулой («иммуноконъюгатом»), такой противовирусное лекарственное средство, второе антитело к вирусу гриппа или любая другая терапевтическая молекула, применяемая в лечении инфекции, вызываемой вирусом гриппа.

[000125] Термин «выделенное антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения антитела, которое по сути не предусматривает других антител (Ab), имеющих другие антигенные специфичности (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывается с НА вируса гриппа, или его фрагмент, который по сути не предусматривает Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от НА вируса гриппа).

[000126] Термины «блокирующее антитело» или «нейтрализующее антитело», используемые в данном документе (или «антитело, которое нейтрализует активность НА вируса гриппа» или «антитело-антагонист»), предназначены для обозначения антитела, связывание которого с антителом к НА вируса гриппа приводит в результате к подавлению по меньшей мере одной биологической активности НА вируса гриппа. Например, антитело, предусмотренное в данном документе, может предупреждать или блокировать присоединение вируса гриппа или

его проникновение в клетку-хозяина. Кроме того, «нейтрализующее антитело» представляет собой такое, которое может нейтрализовывать, т. е. предупреждать, подавлять, уменьшать, препятствовать или мешать способности патогена инициировать и/или обеспечивать инфицирование у хозяина. Термины «нейтрализующее антитело» и «антитело, которое нейтрализует» или «антитела, которые нейтрализуют» используются в данном документе взаимозаменяемо. Эти антитела можно применять отдельно или в комбинации в качестве профилактических или терапевтических средств с другими противовирусными средствами при надлежащем составе, или в связи с активной вакцинацией, или в качестве диагностического инструмента.

Антигенсвязывающие фрагменты

[000127] Если конкретно не указано иное, то термин «антитело», используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий молекулы антител, которые содержат две тяжелые цепи иммуноглобулинов и две легкие цепи иммуноглобулинов (т. е. «полные молекулы антител»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемые в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с НА вируса гриппа В. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В определенных вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту полипептида или его полиспецифической антигенсвязывающей молекуле. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, *например*, из молекул полных антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии,

включающие манипулирование с ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела, и осуществление ее экспрессии. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, *например*, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, *например*, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, включения остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[000128] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (*например*, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (*например*, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т. д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка небольшого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», используемое в данном документе.

[000129] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями или прилегает к ней. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или

V_L - V_L . В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H - или V_L -домен.

[000130] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут находиться в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела, раскрытого в данном документе, включают (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любых иллюстративных конфигурациях, представленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полноразмерной шарнирной или линкерной области или ее части. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела, раскрытого в данном документе, может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из конфигураций переменного и константного доменов, изложенных выше, находящихся в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной(-ых) связи(-ей)).

[000131] Как и в случае с полными молекулами антител антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же антигена. Любой формат полиспецифических антител, в том числе иллюстративные

форматы биспецифических антител, раскрытые в данном документе, могут быть адаптированы для применения в рамках антигенсвязывающего фрагмента антитела, раскрытого в данном документе, с помощью традиционных методик, доступных из уровня техники.

Модификации антител и их антигенсвязывающих фрагментов

[000132] В определенных вариантах осуществления каркасные области антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека, например, идентичными последовательностям антител, представленным в данном документе, или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Одна или более аминокислот в данной каркасной области (или одной или более каркасных областей) могут быть заменены, и при этом замена(-ы) может(-гут) являться консервативной(-ыми) или неконсервативной(-ыми) заменами. Также возможны замена одного или более остатков CDR или удаление одного или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых можно обойтись для связывания без одной или двух CDR. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, исходя из опубликованных кристаллических структур, и сделали заключение, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не имели аминокислотных остатков, вступающих в контакт с антигеном (см. также Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428). Таким образом, предусмотренные в данном документе антитела могут быть эффективно модифицированы в областях CDR и/или каркасных областях, при условии, что модифицированное антитело сохраняет одну или более из требуемых характеристик, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с НА вируса гриппа В с EC_{50} , составляющей менее чем приблизительно 10^{-10} М; и/или демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, после введения указанному животному, инфицированному вирусом гриппа, по сравнению с сопоставимым животным, инфицированным вирусом гриппа, по отношению к которому указанное введение не осуществлялось.

[000133] Модификации в данных CDR могут быть произведены в отношении последовательности CDR из антитела, представленного в данном документе, и модификации могут включать консервативные или неконсервативные замены. Требуемые замены могут быть определены с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. Например, один или более остатков CDR могут быть заменены аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей.

[000134] Кроме того, его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело, описанное в данном документе, однако модифицированное так, чтобы пропускать одну или более из CDR и/или одну или более из каркасных областей, при условии, что модифицированное антитело (также известное как антигенсвязывающий фрагмент) сохраняет способность связываться с НА вируса гриппа В.

[000135] Остатки CDR, которые не вступают в контакт с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в HCDR2 зачастую не нужны) среди областей CDR согласно Kabat, находящихся за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, можно модифицировать с удалением или заменой данной CDR, в частности той, которая не контактирует с антигеном. CDR легкой цепи могут быть заменены, например, на универсальные CDR легкой цепи.

[000136] Полностью человеческие моноклональные антитела к НА вируса гриппа, предусмотренные в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии или по сравнению с последовательностями, предусмотренными в данном документе. Такие модификации или мутации могут быть легко определены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных

последовательностей антител, или путем сравнения аминокислотных последовательностей с последовательностями антител, предусмотренных в данном документе, например, любой из последовательностей антител, предусмотренных в таблице 1.

[000137] Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR модифицированы, при условии, что модифицированное антитело сохраняет одну или более из требуемых характеристик, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с НА вируса гриппа В с EC_{50} , составляющей менее чем приблизительно 10^{-10} M; и/или демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, после введения указанному животному, инфицированному вирусом гриппа, по сравнению с сопоставимым животным, инфицированным вирусом гриппа, по отношению к которому указанное введение не осуществлялось. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более модификаций каркасной области и/или CDR, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные биологические антагонистические или агонистические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п.

[000138] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR мутированы с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначаются как «мутации

зародышевой линии»). Специалист средней квалификации в данной области техники, беря за основу раскрытые в данном документе последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более из отдельных модификаций или мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасных участков и/или CDR в доменах V_H и/или V_L подвергнуты обратной мутации с получением остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергнуты обратной мутации с получением первоначальной последовательности зародышевой линии, *например*, только мутированные остатки, находящиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасных участков и/или CDR мутированы с получением соответствующего(-их) остатка(-ов) из другой последовательности зародышевой линии (*т. е.* последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально было получено антитело). Кроме того, антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, *например*, где определенные отдельные остатки подвергнуты мутации с получением соответствующего остатка из конкретной последовательности зародышевой линии, при этом определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергаются мутации с получением соответствующего остатка из другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичности связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные биологические антагонистические или агонистические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п. Настоящее изобретение охватывает антитела и

антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа.

[000139] Настоящее изобретение предусматривает антитела с «идентичностью по сути» или «сходством по сути» по отношению к последовательностям, предусмотренным в данном документе, в CDR или каркасных областях. Различия в последовательностях, например, различие между последовательностью, предусмотренной в таблице 1 или таблице 2, и модифицированной последовательностью на ее основе отмечены как «идентичность по сути» или «сходство по сути».

[000140] Термины «идентичность по сути» или «по сути идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывают на то, что при оптимальном выравнивании с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной цепью другой нуклеиновой кислоты), имеется идентичность нуклеотидной последовательности в %, составляющая, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична молекуле эталонной нуклеиновой кислоты, может в ряде случаев кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый молекулой эталонной нуклеиновой кислоты.

[000141] Применительно к полипептидам термин «сходство по сути» или «по сути сходный» означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с применением значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере

83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности. В некоторых аспектах положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена по сути не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, – процент или степень аналогичности можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, которая включена в данный документ посредством ссылки.

«Умеренно консервативной» заменой является любое изменение с неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

[000142] Идентичность и/или сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с помощью измерений сходства, присвоенного различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., *например*, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (*например*, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и расчет процента идентичности последовательностей в областях с наибольшим перекрытием между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), *выше*). Последовательности также можно сравнивать с использованием алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием поиска аффинных гэпов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрица BLOSUM 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности, раскрытой в данном документе, с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., *например*, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[000143] В данном документе предусмотрены полностью человеческие моноклональные антитела к HA вируса гриппа, содержащие варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR

и/или CDR, характеризующиеся наличием одной или более замен (например, консервативных замен). Например, настоящее изобретение включает антитела к HA вируса гриппа В, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, *например*, с наличием 20 или меньше, 19 или меньше, 18 или меньше, 17 или меньше, 16 или меньше, 15 или меньше, 14 или меньше, 13 или меньше, 12 или меньше, 11 или меньше, 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислотной замены по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в данном документе. Например, антитело к HA вируса гриппа В может содержать 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену (например, консервативные аминокислотные замены) по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в данном документе.

[000144] В качестве иллюстрации, в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с HA вируса гриппа В, содержащие аминокислотную последовательность HCVR, отличающуюся от SEQ ID NO: 2 на значение, составляющее от по меньшей мере 1 до не более чем 50 консервативных аминокислотных замен, например, от по меньшей мере 10 до не более чем 40 консервативных аминокислотных замен, или от по меньшей мере 20 до не более чем 50 консервативных аминокислотных замен, или от по меньшей мере 20 до не более чем 40 консервативных аминокислотных замен. Также в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с HA вируса гриппа В, содержащие аминокислотную последовательность LCVR, отличающуюся от SEQ ID NO: 10 на значение, составляющее от по меньшей мере 1 до не более чем 50 консервативных аминокислотных замен, например, от по меньшей мере 10 до не более чем 40 консервативных аминокислотных замен, или от по меньшей мере 20 до не более чем 50 консервативных аминокислотных замен, или от по меньшей мере 20 до не более

чем 40 консервативных аминокислотных замен. Такие замены могут быть в каркасных областях или в CDR и поддерживать специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении связывания с HA вируса гриппа В.

[000145] Также в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 4 на 1, или 2, или 3 аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены). В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 6 на 1, или 2, или 3 аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены). В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 8 на 1, или 2, или 3 аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены). В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 12 на 1, или 2, или 3 аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены). В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 14 на 1, или 2, или 3 аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены). В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 16 на 1, или 2, или 3 аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены).

[000146] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), отличающихся от SEQ ID NO: 8/16 на по меньшей мере 1, или по меньшей мере 2, или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6 аминокислотных

замен (например, консервативных аминокислотных замен).

[000147] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (*m. e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в пределах аминокислотной последовательности HCVR/LCVR иллюстративного антитела к HA вируса гриппа В, представленного в таблице 1. В определенных вариантах осуществления группа аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 отличается от SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 на значение, составляющее не более чем 20 консервативных аминокислотных замен, например, не более чем 1, или не более чем 2, или не более чем 3, или не более чем 3, или не более чем 4, или не более чем 5, или не более чем 6, или не более чем 7, или не более чем 8, или не более чем 9, или не более чем 10, или не более чем 11, или не более чем 12, или не более чем 13, или не более чем 14, или не более чем 15, или не более чем 16, или не более чем 17, или не более чем 18, или не более чем 19 консервативных аминокислотных замен.

[000148] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с таблицей 1, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000149] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с таблицей 1, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере

88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000150] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10 или по сути аналогичных им последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ними.

[000151] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000152] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000153] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000154] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000155] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2),

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000156] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ней.

[000157] Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), предусматривающих SEQ ID NO: 8/16, или по сути аналогичных им последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью последовательности с ними.

Получение человеческих антител

[000158] Способы создания человеческих антител у трансгенных мышей известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте, раскрытом в данном документе, для получения человеческих антител, которые специфически связываются с НА вируса гриппа В. Для получения антител к НА вируса гриппа В можно применять иммуноген, предусматривающий любое из следующего. В некоторых вариантах осуществления антитела получены от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным НА вируса гриппа В (см., например, номера доступа в GenBank AAA43697.1. или АСА33493.1), или живым аттенуированным или инактивированным вирусом, или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно белок НА вируса гриппа В или его фрагмент можно получать с применением стандартных биохимических методик и модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой полученный рекомбинантным путем белок НА вируса гриппа В или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой вакцину против вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления можно вводить одну или более бустерных инъекций. В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать один или несколько штаммов вируса гриппа или гемагглютинины, полученные из этих штаммов, например, В/Victoria/2/87, затем В/Yamagata/16/88, а затем снова В/Victoria/2/87 или В/Yamagata/16/88, затем В/Victoria/2/87, а затем снова В/Yamagata/16/88. В некоторых аспектах штамм В/Yamagata заменен на В/Maryland/03/2008, или В/Nanchang/3451/93, или В/Florida/4/2006. Всех мышей можно обрабатывать бустерной смесью ДНК, кодирующих НА из В/Victoria/2/87, В/Yamagata/16/88, В/Maryland/03/2008 и/или В/Florida/4/2006. В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать смесь штаммов вируса гриппа, или смесь гемагглютининов, полученных из этих штаммов, или ДНК, кодирующую НА. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид НА вируса гриппа, экспрессированный в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (СНО), или сам вирус гриппа.

[000159] С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа создания моноклональных антител первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к НА вируса гриппа В, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие переменные области тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышиных константных областей, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем обеспечивают экспрессию ДНК в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[000160] Как правило, в мышь VELOCIMMUNE® вводят представляющий интерес антиген, и из мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки можно подвергнуть слиянию с линией миеломных клеток с получением immortalized lines of cells hybridoma, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с константными областями требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. В качестве альтернативы ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[000161] Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область.

Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Мышинные константные области заменяют на требуемые человеческие константные области с получением полностью человеческого антитела, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя отобранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики, заключающиеся в высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи вариабельной области.

Биологические эквиваленты

[000162] Антитела к НА вируса гриппа В и фрагменты антител, раскрытые в данном документе, охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать НА вируса гриппа. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, однако проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, раскрытые в данном документе последовательности ДНК, кодирующие антитело, охватывают последовательности, которые содержат одно или более из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу являются биологическими эквивалентами антитела или фрагмента антитела, раскрытых в данном документе.

[000163] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень поглощения которых значительно не отличаются при введении одинаковой молярной дозы в сходных экспериментальных условиях в случае либо однократной дозы, либо множества доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны в степени их

поглощения, но не в скорости их поглощения, и все еще могут считаться биологически эквивалентными, поскольку такие различия в скорости поглощения предусмотрены и отражены при введении метки, не являются существенными для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, *например*, при длительном применении, и считаются несущественными с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[000164] В некоторых вариантах осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или активности.

[000165] В некоторых вариантах осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если пациента можно перевести один или более раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска возникновения нежелательных эффектов, в том числе значимого с клинической точки зрения изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности по сравнению с таковой при продолжении терапии без такого перевода.

[000166] В некоторых вариантах осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

[000167] Биологическую эквивалентность можно выявить с помощью способов *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биологической эквивалентности включают, *например*, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными биологической доступности *in vivo* у человека и достаточно прогнозировал их; (c) тест *in vivo* у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность,

эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

[000168] Биологически эквивалентные варианты антител можно конструировать с помощью, например, осуществления разных замен остатков или последовательностей или осуществления делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся значимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить на другие аминокислоты для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, *например*, мутации, которые обеспечивают устранение или удаление гликозилирования.

Антитела к НА вируса гриппа, содержащие Fc-варианты

[000169] В соответствии с определенными вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, предусмотрены антитела к НА вируса гриппа, которые содержат Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с FcRn-рецептором, *например*, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к НА вируса гриппа, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-областях Fc-домена, где мутация(-и) обеспечивает(-ют) повышение аффинности Fc-домена к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где значение pH варьируется от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0) по сравнению с таким же, но немодифицированным антителом. Такие мутации могут приводить в результате к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови по сравнению с таким же, но немодифицированным антителом при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в

положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В некоторых вариантах осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

[000170] Например, настоящее изобретение включает антитела к HA вируса гриппа В, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L), 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E), 428L и 434S (например, M428L и N434S), 257I и 311I (например, P257I и Q311I), 257I и 434H (например, P257I и N434H), 376V и 434H (например, D376V и N434H), 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A), а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Объемом настоящего изобретения предусмотрены все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-домене и другие мутации в пределах вариабельных доменов антитела, раскрытых в данном документе.

[000171] В данном документе предусмотрены антитела к HA вируса гриппа В, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела могут содержать химерную область C_H , содержащую часть домена C_{H2} или весь этот домен, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с частью домена C_{H3} или всем этим доменом, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела содержат химерную область C_H , характеризующуюся наличием химерной шарнирной области. Например, химерный

шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки положений 216–227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью (аминокислотные остатки положений 228–236 согласно нумерации EU), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной последовательности IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной последовательности IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область С_H, описанную в данном документе, может в определенных вариантах осуществления проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на патент США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Биологические характеристики антител

[000172] В целом, антитела, раскрытые в данном документе, функционируют посредством связывания с НА вируса гриппа В. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с НА вируса гриппа В (*например*, при 25°C или при 37°C) с K_D, составляющей менее чем 10 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore или с помощью биодатчика на основе биослойной интерферометрии в реальном времени (анализ Octet HTX). В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают НА вируса гриппа В с K_D, составляющей менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем 250 пМ или менее чем 100 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[000173] Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают НА вируса гриппа В с периодом полудиссоциации ($t^{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 75 минут, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, *например*, с использованием формата анализа, как определено в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, связывают НА вируса гриппа с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 200 минут, более чем приблизительно 300 минут, более чем приблизительно 400 минут, более чем приблизительно 500 минут, более чем приблизительно 600 минут, более чем приблизительно 700 минут, более чем приблизительно 800 минут, более чем приблизительно 900 минут или более чем приблизительно 1000 минут, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, *например*, с использованием формата анализа, как определено в данном документе, (*например*, в формате mAb-ловушки или антигенной ловушки) или по сути аналогичного анализа.

[000174] Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые нейтрализуют инфицирующую способность вируса гриппа в отношении его клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления антитела проявляют нейтрализующую активность в отношении различных репрезентативных вирусов гриппа, *например*, В/Victoria/2/87, В/Yamagata/16/88, В/Maryland/03/2008, В/Nanchang/3451/93 и/или В/Florida/4/2006 с IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 800 нМ, *например*, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 800 пМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 10 пМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 10 пМ до приблизительно 50 пМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 100 пМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 10 пМ до приблизительно 100 пМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 100 пМ до приблизительно 800 пМ, или IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 500 пМ до приблизительно 800 пМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ, IC_{50} , находящейся в диапазоне от приблизительно 10 нМ до

приблизительно 50 нМ, IC₅₀, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 нМ, IC₅₀, находящейся в диапазоне от приблизительно 10 нМ до приблизительно 100 нМ, IC₅₀, находящейся в диапазоне от приблизительно 100 нМ до приблизительно 800 нМ, или IC₅₀, находящейся в диапазоне от приблизительно 500 нМ до приблизительно 800 нМ, в анализе микронеutralизации или по сути аналогичном анализе.

[000175] Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клетками, инфицированными гриппом В, в суб-нМ концентрации и демонстрируют специфическое связывание с НА (см. пример 3).

[000176] Настоящее изобретение также включает антитела против гриппа В НА, которые демонстрируют усиление защиты (по сравнению с субъектом, не получавшим лечение) или сильную нейтрализацию инфекции, вызванной вирусом гриппа В, *in vivo*. Определенные антитела проявляют защитную функцию при введении с профилактической целью (до инфицирования; см. пример 4). В некоторых вариантах осуществления одна доза антитела к НА в количестве 5 мг/кг или 0,5 мг/кг, введенная за 5 дней до инфицирования, приводила в результате к 100% выживаемости мышей при введении с профилактической целью по сравнению с мышами, обработанными человеческим антителом IgG1 изотипического контроля.

[000177] Профилактическое лечение антителами к НА вируса гриппа В или их антигенсвязывающими фрагментами способно обеспечивать защиту млекопитающего от инфекции, например, при последующем воздействии вируса гриппа, или снижение вероятности или риска инфицирования при последующем воздействии вируса гриппа. Указанная защитная функция выбрана из группы, состоящей из уменьшения интенсивности, снижения выраженности или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа. В некоторых аспектах выделенное антитело при введении с профилактической целью животному (например, млекопитающему) до воздействия вируса гриппа (например, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней или от 2 до 5 дней до воздействия вируса гриппа) снижает риск инфекции, вызванной вирусом

гриппа. По меньшей мере один симптом может быть выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительных болей, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и летального исхода.

[000178] В одном варианте осуществления выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с НА вируса гриппа В, имеют одну или более из следующих характеристик: (а) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело; (б) связываются с НА вируса гриппа В с EC_{50} , составляющей менее чем приблизительно 10^{-9} , менее чем приблизительно 10^{-10} М, менее чем приблизительно 10^{-11} М, менее чем приблизительно 10^{-12} М или менее чем приблизительно 10^{-13} М; (с) демонстрируют увеличение выживаемости у животного, инфицированного вирусом гриппа, по сравнению с сопоставимым животным, инфицированным вирусом гриппа, по отношению к которому не осуществлялось лечение с помощью выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с НА вируса гриппа В; и/или (d) содержат (i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

[000179] Антитела, раскрытые в данном документе, могут обладать одной или более из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией. Другие биологические характеристики антител, раскрытых в данном документе, будут очевидны специалисту средней квалификации в данной области из обзора настоящего изобретения, включая практические примеры, предусмотренные в данном документе.

Картирование эпитопов и связанные с ним методики

[000180] Настоящее изобретение включает антитела к НА вируса гриппа В,

которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в одном или более доменах молекулы НА вируса гриппа В. Эпитоп, с которым антитела связываются, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах молекулы НА вируса гриппа (*например*, линейного эпитопа в домене). В качестве альтернативы эпитоп может состоять из совокупности несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в молекуле НА вируса гриппа В (*например*, конформационный эпитоп).

[000181] Разные методики, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для определения наличия «взаимодействия с одной или более аминокислотами» антитела в пределах полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, стандартный эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие, как описаны в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают аланин-сканирующий мутагенез, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования с расщеплением пептидов и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстрагирование эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый при помощи масс-спектрометрии. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченым дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному дейтерий-водородному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности взаимодействия. Как результат, аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, проявлять относительно более высокие массы по сравнению с

аминокислотами, не включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, за счет чего выявляют остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) *Analytical Chemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73. 256A-265A.

[000182] Термин «эпитоп» относится к участку на антигене, в отношении которого у В- и/или Т-клеток развивается ответ. В-клеточные эпитопы могут образовываться из как непрерывных аминокислот, так и не являющихся непрерывными аминокислот, сближенных за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные непрерывными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные за счет укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно предусматривает по меньшей мере 3 аминокислоты или по меньшей мере 4 аминокислоты, например, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[000183] Профилирование с модификацией (MAP), также известное как профилирование антител с модификацией структуры антигена (ASAP), представляет собой способ категоризации больших количеств моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, исходя из подобия профилей связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. US 2004/0101920, который, в частности, включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте). Каждой категории может соответствовать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного в другой категории, либо частично перекрывается с ним. Данная технология обеспечивает возможность быстрого отбора генетически идентичных антител с тем, чтобы определение характеристик можно было сфокусировать на генетически разнородных антителах. При использовании в отношении скрининга гибридомы MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридомы,

которые продуцируют моноклональные антитела с требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител, предусмотренных в данном документе, в группы антител, связывающих разные эпитопы.

[000184] В определенных вариантах осуществления антитела к HA вируса гриппа А или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах любой из одной или более областей, представленных в HA вируса гриппа, либо в природной форме или форме, полученной рекомбинантным путем, либо с его фрагментом.

[000185] Настоящее изобретение также включает антитела к HA вируса гриппа В, которые связываются с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа. Аналогичным образом настоящее изобретение также включает антитела к HA вируса гриппа В, которые конкурируют за связывание с HA вируса гриппа В или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе. Например, настоящее изобретение включает антитела к HA вируса гриппа В, которые перекрестно конкурируют за связывание с HA вируса гриппа В с одним или более антителами, полученными из антител, описанных в таблице 1.

[000186] С применением известных способов можно определить, связывается ли антитело, или конкурирует ли оно за связывание, с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к HA вируса гриппа В. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к HA вируса гриппа В, обеспечивают возможность связывания эталонного антитела с HA вируса гриппа В или пептидом в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой HA вируса гриппа В. Если тестируемое антитело способно связываться с HA вируса гриппа В после насыщения связывания с помощью эталонного антитела к HA вируса гриппа В, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к HA вируса гриппа В. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с HA вируса гриппа В после насыщения связывания с помощью эталонного антитела к HA вируса гриппа В, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом к HA вируса гриппа.

[000187] Для определения того, конкурирует ли антитело с эталонным антителом к НА вируса гриппа В за связывание, описанную выше методику исследования связывания осуществляют в двух направлениях. В первом направлении обеспечивается возможность связывания эталонного антитела с НА вируса гриппа В в условиях насыщения с последующим оцениванием связывания тестируемого антитела с молекулой НА вируса гриппа В. Во втором направлении обеспечивается возможность связывания тестируемого антитела с молекулой НА вируса гриппа В в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой НА вируса гриппа В. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно к связыванию с молекулой НА вируса гриппа В, то делается заключение, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с НА вируса гриппа В. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, как и эталонное антитело, однако может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающего или смежного эпитопа.

[000188] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающим эпитопом, если каждое конкурентно подавляет (блокирует) связывание других антител с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела подавляет связывание других на по меньшей мере 50%, например, на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы два антитела имеют один и тот эпитоп, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела. Два антитела имеют перекрывающийся эпитоп, если некоторые аминокислотные мутации, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела.

[000189] Дополнительные стандартные эксперименты (например, мутации в пептидах и анализы связывания) можно в дальнейшем провести для того, чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено фактом связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или

что стерическое блокирование (или другое явление) является ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно проводить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, существующего в данной области техники.

Иммуноконъюгаты

[000190] В данном документе предусмотрено человеческое моноклональное антитело к НА вируса гриппа В, конъюгированное с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгатом»), таким как анатоксин или противовирусное лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. Используемый в данном документе термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым фрагментом или фрагментом-репортером, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средством. Данное антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым фрагментом или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средством в любом месте по всей длине молекулы, которая является настолько длинной, что она способна связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитела и лекарственного средства и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления данное средство может представлять собой второе отличающееся антитело к НА вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления данное антитело может быть конъюгировано со средством, которое является специфичным по отношению к клеткам, инфицированным вирусом. При выборе типа терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к НА вируса гриппа, примут во внимание подлежащее лечению состояние и требующий достижения терапевтический эффект. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела

[000191] Антитела, раскрытые в данном документе, могут быть

моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфичными по отношению к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, которые специфичны к нескольким целевым полипептидам. См., *например*, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

[000192] Любые из предусмотренных в данном документе полиспецифических антигенсвязывающих молекул или их вариантов можно конструировать с применением стандартных молекулярно-биологических методик (например технологии рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области техники.

[000193] В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к НА вируса гриппа В, получают в биспецифическом формате («би-специфические» или «биспецифические»), в котором переменные области, связывающиеся с отличающимися доменами НА вируса гриппа В, соединены вместе для придания двухдоменной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответственно, полученные свойства биспецифичности могут усиливать общую ингибиторную эффективность по отношению к белку НА вируса гриппа В посредством увеличения как специфичности, так и avidности связывания. Переменные области, специфичные к отдельным доменам (*например*, сегменты N-концевого домена), или те, которые могут связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами, или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере для создания биспецифичности переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы со специфичностью в отношении одного домена подвергают рекомбинации с переменными областями легкой цепи (V_L) из ряда связывающих молекул со специфичностью в отношении второго домена для идентификации некогнатных партнеров V_L , которые можно объединять в пару с исходным V_H без нарушения первоначальной специфичности V_H . Таким же образом можно объединять отдельный сегмент V_L (*например*, V_{L1}) с двумя разными V_H -доменами (*например*, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих «плечей»

($V_{H1} - V_{L1}$ и $V_{H2} - V_{L1}$). Использование отдельного сегмента V_L уменьшает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность способов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

[000194] В качестве альтернативы антитела, которые связывают несколько доменов и вторую мишень, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к HA вируса гриппа В, можно получать в биспецифическом формате с использованием описанных в данном документе методик или других методик, известных специалистам в данной области техники. Варибельные области антитела, связывающиеся с отличающимися областями, можно соединять вместе с варибельными областями, которые связываются с соответствующими участками, например, на вирусе гриппа, для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответствующим образом сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Варибельные области со специфичностью к внеклеточному домену объединяют с варибельной областью со специфичностью к наружной части внеклеточного домена и объединяют в пару на структурном каркасе, что дает возможность каждой варибельной области связываться с отдельными антигенами.

[000195] Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте, раскрытом в данном документе, включает использование C_{H3} -домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_{H3} -домена второго Ig, где C_{H3} -домены первого и второго Ig отличаются друг от друга на по меньшей мере одну аминокислоту, и где отличие на по меньшей мере одну аминокислоту ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует отличие по аминокислотам. В одном варианте осуществления первый C_{H3} -домен Ig связывает белок А, а второй C_{H3} -домен Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание белка А, такую как модификация Н95R (нумерация экзонов согласно IMGT; Н435R нумерация согласно EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно

обнаружить в пределах второго C_H3: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в пределах объема, раскрытого в данном документе.

[000196] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте, раскрытом в данном документе, включают без ограничения, *например*, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слитые белки IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, «выступы-во-впадины», общую легкую цепь (*например*, общую легкую цепь со структурой «выступы-во-впадины» и т. п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-антитело, «лейциновую застежку», Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (в отношении обзора вышеизложенных форматов см., *например*, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и цитируемые в нем ссылки). Биспецифические антитела также можно конструировать с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, *например*, где не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой. (См., *например*, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы

[000197] В данном документе предусмотрены терапевтические композиции, содержащие антитела к НА вируса гриппа В или их антигенсвязывающие фрагменты. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т. п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, хорошо известном всем химикам-

фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие (катионные или анионные) липиды пузырьки (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа «масло воде» и «вода в масле», эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[000198] Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т. п. При использовании антитела, раскрытого в данном документе, для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для предупреждения такого заболевания преимущественным является введение антитела, раскрытого в данном документе, как правило, в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 60 мг/кг веса тела, или от приблизительно 5 до приблизительно 60, от приблизительно 10 до приблизительно 50 или от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и длительность лечения. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в качестве начальной дозы, составляющей от по меньшей мере приблизительно 0,1 мг до приблизительно 5000 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 10 мг до приблизительно 500 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В определенных вариантах осуществления после начальной дозы может следовать введение вторичной дозы или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же самым или меньше начальной дозы, где повторные введения доз разделены промежутком от по меньшей мере 1 дня до 3 дней; в по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей

мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

[000199] Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции, *например*, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., *например*, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, *например*, инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (*например*, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т. д.), и ее можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в пузырьке, в частности в липосоме (см., *например*, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

[000200] Также в данном документе предусмотрено применение наночастиц для доставки антител, раскрытых в данном документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать для применений как в терапии, так и в диагностике. Наночастицы, конъюгированные с антителом, и способы их получения и применения подробно описаны в Arguebo, M., et al. 2009 («Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications» in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в данный документ посредством ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целенаправленного воздействия на инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны в патентных документах, *например*, US 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен в данный документ во всей своей полноте.

[000201] В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать помпу. В другом варианте осуществления можно

использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени для композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы.

[000202] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, интракраниальных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, для капельных инфузий и т. п. Эти инъекционные препараты можно получить с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получить, *например*, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. Водной средой для инъекций, является, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т. п., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (*например*, этанол), многоатомный спирт (*например*, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. п. В качестве масляной среды используют, *например*, кунжутное масло, соевое масло и т. п., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. п. Полученным таким образом инъекционным составом наполняется подходящая ампула.

[000203] Фармацевтическую композицию, раскрытую в данном документе, можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, свободно можно применять устройство для доставки по типу шприца-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручки обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и поместить новый картридж,

который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприц-ручки затем можно повторно использовать. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприц-ручки сменный картридж отсутствует. Вернее, одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручки предварительно заполнено фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения из резервуара фармацевтической композиции выбрасывают все устройство.

[000204] При подкожной доставке фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, применяют разнообразные многоразовые устройства для доставки по типу шприца-ручки и автоинъектора. Примеры включают, но, разумеется, без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь несколько из них. Примеры одноразовых устройств для доставки по типу шприца-ручки, применяемых при подкожной доставке фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, включают, но разумеется, без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния, США), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс, США), при этом упомянуты лишь несколько из них.

[000205] Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в лекарственных формах в стандартной дозе, приспособленной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции

(ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 5000 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; в частности в форме инъекционного состава; в случае других лекарственных форм предпочтительно, чтобы содержание антитела составляло от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг.

Виды применения антител в терапии

[000206] Антитела, раскрытые в данном документе, применимы для лечения и/или предупреждения заболевания, или нарушения, или состояния, ассоциированных с инфекцией, вызванной вирусом гриппа В, и/или для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием.

[000207] В определенных вариантах осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, применимы для лечения субъектов, страдающих от тяжелой и острой респираторной инфекции, вызванной вирусом гриппа В. В некоторых вариантах осуществления антитела применимы в снижении вирусных титров или снижении вирусной нагрузки у хозяина. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией, вызванной вирусом гриппа В.

[000208] Одно или более антител, раскрытых в данном документе, можно вводить для ослабления, предупреждения или снижения тяжести одного или более симптомов или состояний, связанных с заболеванием или нарушением, по сравнению с субъектом, не получавшим лечение, но находящимся в аналогичной ситуации. Антитела можно применять для уменьшения интенсивности или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, включая без ограничения лихорадку, кашель, боль в горле, головную боль, боли в теле, утомляемость, сильное истощение, одышку, бронхит, пневмонию и летальный исход.

[000209] Также в данном документе предусмотрено применение с профилактической целью одного или более антител, раскрытых в данном документе, у субъектов с риском развития инфекции, вызванной вирусом гриппа, таких как

индивидуумы с ослабленным иммунитетом, пожилые люди (возрастом 65 лет или старше), дети возрастом младше 2 лет, работники сферы здравоохранения, члены семьи, находящиеся рядом с пациентом, страдающим инфекцией, вызванной вирусом гриппа, и пациенты с сопутствующими нарушениями в анамнезе (например, с повышенным риском легочной инфекции, заболеванием сердца или диабетом).

[000210] В дополнительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции, вызванной вирусом гриппа. В другом варианте осуществления антитела применяют в качестве вспомогательной терапии с каким-либо другим средством или любым другим видом терапии, известными специалистам в данной области, применимыми для лечения или уменьшения интенсивности инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Виды комбинированной терапии

[000211] Виды комбинированной терапии могут включать антитело к НА вируса гриппа В и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно преимущественно объединять с антителом или биологически активным фрагментом антитела. Антитела, раскрытые в данном документе, можно синергически объединять с одним или более лекарственными средствами или средствами (*например*, противовирусными средствами), применяемыми для лечения гриппа.

[000212] Например, иллюстративные противовирусные средства включают, например, вакцины, ингибиторы нейраминидазы или аналоги нуклеозидов. Другие иллюстративные противовирусные средства, которые можно применять в комбинации с антителом, предусмотренным в данном документе, могут включать, например, зидовудин, ганцикловир, видарабин, идоксуридин, трифлуридин, фоскарнет, ацикловир, рибавирин, амантадин, ремантадин, саквинавир, индинавир, ритонавир, альфа-интерфероны и другие интерфероны, ингибитор нейраминидазы (*например*, занамивир (RELENZA®), осельтамивир (TAMIFLU®) ланинамивир, перамивир) или римантадин.

[000213] Другие иллюстративные противовирусные лекарственные средства включают без ограничения ингибитор НА, ингибитор сиаловой кислоты и

ингибитор ионного канала M2. В одном варианте осуществления ингибитором ионного канала M2 является амантадин или римантадин.

[000214] В некоторых вариантах осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, можно объединять со вторым терапевтическим средством для снижения вирусной нагрузки у пациента с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, или для уменьшения интенсивности одного или более симптомов инфекции.

[000215] Антитела, раскрытые в данном документе, можно применять в комбинации с противовоспалительным лекарственным средством (*например*, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), деконгестантом, антигистаминным лекарственным средством, противомикробным лекарственным средством, другим антителом к вирусу гриппа, противовирусным лекарственным средством, вакциной против вируса гриппа, такой как FLUMIST® или FLUVIRIN®, пищевой добавкой, такой как антиоксиданты, или любым другим средством паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. Паллиативная терапия предусматривает лечение субъекта с целью повышения для него уровня комфорта и/или облегчения тяжести симптомов инфекции, вызванной вирусом гриппа В.

[000216] В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к вирусу гриппа. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к гемагглютнину вируса гриппа (*например*, гемагглютнину вируса гриппа А). В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к другому белку вируса гриппа, такому как нейраминидаза или тетрамерный эктодомен матричного белка 2 (белок M2e). В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой антитело к другому белку, такому как трансмембранная сериновая протеаза 2 (TMPRSS2). Второе антитело может быть специфичным в отношении одного или более различных белков вируса гриппа из различных подтипов или штаммов вируса. В данном документе представлено применение комбинации («коктейля») антител с широким спектром нейтрализующей

или ингибирующей активностью по отношению к вирусу гриппа. В некоторых вариантах осуществления не конкурирующие антитела можно объединять и вводить нуждающемуся в этом субъекту для снижения способности вируса гриппа ускользнуть посредством быстрой мутации как результата селективного давления. В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие комбинацию, связываются с различными неперекрывающимися эпитопами на белке НА. Антитела, содержащие комбинацию, могут блокировать присоединение вируса, и/или вхождение в клетки-хозяева, и/или слияние с клетками-хозяевами. Антитела могут взаимодействовать с гемагглютинином, выбранным из любого одного или более штаммов вируса гриппа В, и при их использовании по отдельности или в комбинации с любым одним или более из средств, указанных выше, могут нейтрализовать любой один или более из штаммов вируса гриппа В, включая В/Victoria/2/87, В/Yamagata/16/88, В/Maryland/03/2008, В/Nanchang/3451/93 и/или В/Florida/4/2006.

[000217] В данном документе также предполагается применение комбинации антител к НА вируса гриппа в дополнение к антителам к НА вируса гриппа В, раскрытым в данном документе, где комбинация содержит одно или более антител, которые не конкурируют перекрестно. В некоторых вариантах осуществления данная комбинация включает первое антитело с широким спектром нейтрализующей активности и второе антитело с активностью против узкого спектра изолятов, и это антитело не конкурирует перекрестно с первым антителом.

[000218] Используемый в данном документе термин «в комбинации с» означает, что дополнительный(-ые) терапевтически активный(-ые) компонент(-ы) можно вводить до введения антитела к НА вируса гриппа В, раскрытого в данном документе, параллельно с ним или после него. Выражение «в комбинации с» также включает последовательное или совместное введение антитела к НА вируса гриппа и второго терапевтического средства.

[000219] Дополнительный(-ые) терапевтически активный(-ые) компонент(-ы) можно вводить субъекту до введения антитела к НА вируса гриппа В, раскрытого в данном документе. Например, первый компонент может считаться введенным «перед» вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 часа до, за 60 часов до, за 48 часов до, за 36 часов до, за 24 часа до, за 12 часов до, за 6

часов до, за 5 часов до, за 4 часа до, за 3 часа до, за 2 часа до, за 1 час до, за 30 минут до, за 15 минут до, за 10 минут до, за 5 минут до или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(-ые) терапевтически активный(-ые) компонент(-ы) можно вводить субъекту после введения антитела к НА вируса гриппа В, раскрытого в данном документе. Например, первый компонент может считаться введенным «после» второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, через 5 минут после, через 10 минут после, через 15 минут после, через 30 минут после, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа после, через 4 часа после, через 5 часов после, через 6 часов после, через 12 часов после, через 24 часа после, через 36 часов после, через 48 часов после, через 60 часов после или через 72 часа после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(-ые) терапевтически активный(-ые) компонент(-ы) можно вводить субъекту параллельно с введением антитела к НА вируса гриппа В, раскрытого в данном документе. «Параллельное» введение для целей настоящего изобретения включает, *например*, введение субъекту антитела к НА вируса гриппа В и дополнительного терапевтически активного компонента в единичной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 минут или меньше относительно друг друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму вводят посредством одного и того же пути (*например*, как антитело к НА вируса гриппа В, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т. д.); альтернативно каждую лекарственную форму можно вводить посредством разных путей (*например*, антитело к НА вируса гриппа В можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). Так или иначе, но все введения компонентов в единичной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах или в отдельных лекарственных формах разными путями считаются «одновременным введением» для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего раскрытия введение антитела к НА вируса гриппа В, осуществляемое «до» введения дополнительного терапевтически активного компонента, «параллельно» с ним или «после» него (как эти термины определены в данном документе выше), рассматривается как введение

антитела к НА вируса гриппа В «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

[000220] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к НА вируса гриппа В, раскрытое в данном документе, составлено совместно с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других частях данного документа.

Схемы введения

[000221] В соответствии с определенными вариантами осуществления однократную дозу антитела к НА вируса гриппа В или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию такого антитела к НА вируса гриппа или его фрагмента и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в данном документе), можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом. В соответствии с определенными вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, несколько доз антитела к НА вируса гриппа (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к НА вируса гриппа и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к НА вируса гриппа В. Используемый в данном документе термин «последовательное введение» означает, что каждую дозу антитела к НА вируса гриппа В вводят субъекту в отдельный момент времени, *например*, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (*например*, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение предусматривает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к НА вируса гриппа В, затем одной или более вторичных доз антитела к НА вируса гриппа В, а затем необязательно одной или более третичных доз антитела к НА вируса гриппа В.

[000222] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антитела к НА вируса

гриппа В. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также обозначается как «исходная доза»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальных, вторичных и третичных доз могут содержать одинаковое количество антитела к НА вируса гриппа А, но, как правило, могут отличаться друг от друга по частоте введения. Однако в определенных вариантах осуществления количество антитела к НА вируса гриппа В, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (*например*, при необходимости корректируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4 или 5) доз вводили в начале схемы лечения в виде «нагрузочных доз» с последующим введением последующих доз, которые вводят с меньшей частотой (*например*, «поддерживающие дозы»).

[000223] В определенных иллюстративных вариантах осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят в течение периода времени от 1 до 48 часов (*например*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», используемая в данном документе, означает дозу антитела к НА вируса гриппа В в последовательности из нескольких введений, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без введения промежуточных доз.

[000224] Способы в соответствии с данным аспектом могут предусматривать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела к НА вируса гриппа В. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичных доз вводят пациенту. Подобным образом, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичных доз вводят пациенту.

[000225] В определенных вариантах осуществления частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать на протяжении схемы лечения. Частоту введения может корректировать врач в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Виды применения антител в диагностике

[000226] Антитела к НА вируса гриппа В можно использовать для выявления и/или измерения НА вируса гриппа В в образце, *например*, для диагностических целей. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено использование одного или более антител в анализах для выявления заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы для НА вируса гриппа В могут предусматривать, *например*, приведение полученного от пациента образца в контакт с антителом к НА вируса гриппа В, где антитело к НА вируса гриппа В является меченым с помощью выявляемой метки или молекулы-репортера или используется в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения НА вируса гриппа В из образцов от пациента. В качестве альтернативы, немеченое антитело к НА вируса гриппа В можно применять в областях, связанных с диагностикой, в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченым с помощью выявляемой метки. Выявляемая метка или молекула-репортер может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для выявления или измерения содержания НА вируса гриппа В в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активируемых клеток (FACS).

[000227] Образцы, которые можно использовать в анализах диагностики НА вируса гриппа В, включают образец любой ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит выявляемые количества либо НА вируса гриппа В, либо его фрагменты, при нормальном или патологическом состояниях. Как правило, уровни НА вируса гриппа В в конкретном образце, полученном от здорового

пациента (*например*, пациента, не страдающего заболеванием, ассоциированным с гриппом, можно измерять для первоначального определения исходного уровня или стандартного уровня НА вируса гриппа В. Затем данный исходный уровень НА вируса гриппа В можно сравнивать с уровнями НА вируса гриппа В, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие или имеющих ассоциированное с НА вируса гриппа В состояние или симптомы, ассоциированные с таким состоянием.

[000228] Антитела, специфичные к НА вируса гриппа В, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности.

ПРИМЕРЫ

[000229] Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и композиции, применимые в данном документе, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количеству, температуре и т. п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по весу, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Получение человеческих антител к гемагглютнину вируса гриппа В (НА)

[000230] Человеческие антитела к гемагглютнину вируса гриппа получали с использованием мыши VELOCIMMUNE[®], содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали с помощью комбинации векторов, экспрессирующих гемагглютнин вируса гриппа А и В, с последующим инфицированием штаммами гриппа А и В и выздоровлением, с последующей бустерной инъекцией, предусматривающей смесь рекомбинантных белков гемагглютнина. Гуморальный иммунный ответ контролировали с использованием иммунологического анализа, специфичного в отношении НА вируса гриппа. Антитела к НА вируса гриппа В выделяли непосредственно из антиген-положительных мышиных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который, в частности, включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. С использованием данного способа получали полностью человеческие антитела к НА вируса гриппа (*m. e.* антитела, обладающие человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами).

[000231] Иллюстративное антитело, описанное в данном документе, обозначено как mAb 35490. Биологические свойства иллюстративного антитела, полученного в соответствии со способами из данного примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей

[000232] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR, а также последовательности тяжелой и легкой цепей иллюстративного антитела к НА вируса гриппа В. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в таблице 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:									
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC
mAb35490	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20

Таблица 2. Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:									
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC
mAb35490	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19

[000233] Антитела, описанные в данном документе, имеют полностью человеческие переменные области, однако могут иметь мышиные константные области (например, мышиный Fc IgG1 или мышиный Fc IgG2 (изотип а или b)) или человеческие константные области (например, человеческий Fc IgG1 или человеческий Fc IgG4). Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc другого изотипа (*например*, антитело с Fc из IgG1 мыши можно превращать в антитело с Fc из IgG4 человека и т. д.), но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 1 и 2, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания будут идентичными или по сути сходными независимо от природы Fc-домена.

Пример 3. Связывание антитела к гемагглютиниону с клетками, инфицированными вирусом гриппа

[000234] Клетки MDCK London высевали в количестве 40000 клеток/лунка в 50 мкл инфекционной среды (DMEM, содержащей 1% пирувата натрия, 0,21% раствора BSA с низким содержанием IgG и 0,5% гентамицина) в 96-луночный планшет. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение четырех часов. Затем осуществляли инфицирование с внесением в планшеты 50 мкл вируса гриппа B/Florida/4/2006 (вакцинный штамм линии B/Yamagata) при разбавлении 10E-2,5, их осторожно постукивали и помещали обратно при 37°C, 5% CO₂, на 20 часов. Затем планшеты один раз промывали с помощью PBS и фиксировали с помощью 50 мкл 4% PFA в PBS и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза с помощью PBS и блокировали с помощью 300 мкл блокирующего буфера StartingBlock™ (PBS) (Thermo Fisher Scientific) в течение одного часа при комнатной температуре. Антитело к HA вируса гриппа B mAb35490P (представленное в формате с Fc IgG1 человека) и человеческое антитело IgG1 изотипического контроля разбавляли до начальной концентрации 100 мкг/мл в

блокирующем буфере и титровали 1:4 до конечной концентрации $6,1E-3$ мкг/мл. После инкубирования блокирующий буфер удаляли из планшетов и к клеткам добавляли разбавленные антитела при 75 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После инкубирования планшеты промывали три раза с помощью промывочного буфера (забуференный имидазолом физиологический раствор и Tween® 20, разбавленный до 1X в воде Milli-Q) и наносили 75 мкл/лунка вторичного антитела (конъюгированного с пероксидазой антитела осла к IgG человека AffiniPure, Jackson ImmunoResearch), разбавленного 1:2000 в блокирующем буфере. Вторичный раствор инкубировали в планшетах в течение одного часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали три раза с помощью промывочного буфера и добавляли по 75 мкл/лунка субстрата для проявления ELISA Pico (полученного при соотношении 1:1). Планшеты сразу же считывали в отношении люминесценции на планшетном ридере Molecular Devices Spectramax i3x, и данные относительно EC_{50} показаны в таблице 3.

Таблица 3. ELISA для определения связывания антител к НА с использованием клеток, инфицированных FluB

Антитело	EC_{50} , log[M]
Человеческое IgG1 изотипического контроля	Связывание отсутствует
mAb35490	$7,610E-10$

[000235] Как видно из таблицы 3, mAb35490 связывалось с клетками, инфицированными вирусом гриппа В, в суб-нМ концентрации, демонстрируя специфическое связывание с НА.

Пример 4. Предупреждение смертности, вызванной вирусом гриппа В, посредством профилактического введения антител

[000236] Мышей Balb/C Elite обрабатывали с помощью mAb35490 в количестве 5 мг/кг или 0,5 мг/кг (представленного в формате с Fc IgG1 человека) или человеческого антитела IgG1 изотипического контроля в количестве 5 мг/кг, разбавленного в PBS, посредством подкожной инъекции в заднюю часть шеи за пять дней до инфицирования. В день инфицирования исходный штамм вируса гриппа В/Florida/4/2006 оттаивали на льду и разбавляли в PBS из исходного раствора, содержащего $2,05E08$ БОЕ/мл, с обеспечением содержания 4000 БОЕ вируса в 20 мкл

PBS (2,0E05 БОЕ/мл). Вирус все время выдерживали на льду. Каждой мышке путем инъекции вводили коктейль из кетамина в количестве 2,4 мг/кг и ксилазина в количестве 0,1 мг/кг и их оставляли на примерно 10—15 минут, пока они полностью не погружались в сон. Затем каждой мышке интраназально вводили дозу 20 мкл вируса (4000 БОЕ) с обеспечением полного вдыхания ими вируса. Затем мышкой контролировали в отношении потери веса и заболеваемости в течение двух недель после инфицирования. При потере веса на 25% и больше от исходного веса на момент инфицирования проводили эвтаназию. Результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4. Уровень выживаемости мышек после введения mAb35490 или изотипического контроля

Антитело	Доза (мг/кг)	% выживаемости (через 2 недели после инфицирования)
mAb35490	5	100
mAb35490	0,5	100
Человеческое IgG1 изотипического контроля	5	0 (подвергнутые эвтаназии через 8 дней после инфицирования)

[000237] Все животные, получавшие обработку с помощью человеческого антитела IgG1 изотипического контроля, погибали от инфекции, и при этом они нуждались в эвтаназии через восемь дней после инфицирования. Все животные, получавшие mAb35490 как в количестве 5 мг/кг, так и в количестве 0,5 мг/кг, выживали при инфекции, демонстрируя эффективность антитела mAb35490 к НА вируса гриппа В.

Формула изобретения

1. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) вируса гриппа В, где антитело имеет одну или более из следующих характеристик:

(a) связывается с НА вируса гриппа В с EC_{50} , составляющей менее чем приблизительно 10^{-9} М;

(b) демонстрирует увеличение выживаемости у животного, инфицированного вирусом гриппа В, после введения указанному животному, инфицированному вирусом гриппа В, по сравнению с сопоставимым животным, инфицированным вирусом гриппа В, по отношению к которому указанное введение не осуществлялось; и/или

(c) содержит (i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с HCVR, представленной под SEQ ID NO: 2; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2, и LCDR3), содержащиеся в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с LCVR, представленной под SEQ ID NO: 10.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где при их введении с профилактической целью млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 5 мг/кг веса тела млекопитающего или приблизительно 0,5 мг/кг, обеспечивается защита млекопитающего от инфекции при последующем воздействии вируса гриппа В.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где при их введении с профилактической целью млекопитающему до воздействия вируса гриппа В у млекопитающего снижается риск инфекции, вызванной вирусом гриппа.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—3, где при введении указанных выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента млекопитающему указанные выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают уменьшение интенсивности, снижение выраженности или уменьшение тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у указанного млекопитающего.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительных болей, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и летального исхода.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—5, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 80%, через 19 дней после введения.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—6, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 90%, через 19 дней после введения.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—7, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—5, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 80%, через 19 дней после введения.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—5 и п. 9, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 90%, через 19 дней после введения.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—5, 9 и п. 10, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 6—11, где указанный уровень выживаемости наблюдается через 13 дней после введения.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—12, содержащие HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—13, содержащие LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

(a) домен HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4;

(b) домен HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6;

(c) домен HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8;

(d) домен LCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12;

(e) домен LCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14; и

(f) домен LCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, где указанные выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с гемагглютинином (НА) вируса гриппа В.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15 или п. 16, где при их введении с профилактической целью млекопитающему в виде однократной внутривенной дозы, составляющей приблизительно 5 мг/кг веса тела млекопитающего или приблизительно 0,5 мг/кг, обеспечивается защита млекопитающего от инфекции при последующем воздействии вируса гриппа В.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 15—17, где при их введении с профилактической целью млекопитающему до воздействия вируса гриппа В у млекопитающего снижается риск инфекции, вызванной вирусом гриппа.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 15—18, где при введении указанного выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента млекопитающему указанные выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают уменьшение интенсивности, снижение выраженности или уменьшение тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у указанного млекопитающего.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительных болей, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и летального исхода.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—20, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 80%, через 19 дней после введения.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—21, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий по меньшей мере приблизительно 90%, через 19 дней после введения.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—22, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 0,5 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения.

24. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—20, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 80%, через 19 дней после введения.

25. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—20 и п. 24, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 90%, через 19 дней после введения.

26. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—20, 24 и п. 25, где при их введении каждому представителю совокупности млекопитающих в виде однократной профилактической дозы, составляющей приблизительно 5,0 мг/кг, в указанной совокупности млекопитающих наблюдается уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, через 19 дней после введения.

27. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 21—26, где указанный уровень выживаемости наблюдается через 13 дней после введения.

28. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—27, содержащие HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 14—28, содержащие LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10.

30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—29, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—30, которые представлены антителом изотипа IgG1.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—30, которые представлены антителом изотипа IgG4.

33. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—30, которые представлены биспецифическим антителом.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—33 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

35. Фармацевтическая композиция по п. 34, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит второе терапевтическое средство.

36. Фармацевтическая композиция по п. 35, где указанное второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела, которое специфически связывается с НА вируса гриппа, вакцины против вируса гриппа, пищевой добавки и другого средства паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

37. Фармацевтическая композиция по п. 36, где указанное противовоспалительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств.

38. Фармацевтическая композиция по п. 36, где указанная пищевая добавка представляет собой антиоксидант.

39. Фармацевтическая композиция по п. 36, где указанное противовирусное лекарственное средство представляет собой осельтамивир.

40. Фармацевтическая композиция по п. 36, где указанное противовирусное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против вируса гриппа А.

41. Фармацевтическая композиция по п. 40, где указанное лекарственное средство против вируса гриппа А представляет собой антитело.

42. Фармацевтическая композиция по п. 41, где указанное антитело специфически связывается с НА вируса гриппа А.

43. Полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR или LCVR антитела по любому из пп. 1—33.

44. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 43.

45. Клетка, содержащая вектор по п. 28.

46. Способ предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, у субъекта, инфицированного вирусом гриппа, при этом способ включает введение указанному субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1—33 или фармацевтической композиции по любому из пп. 34—42.

47. Способ по п. 46, где указанный по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, кашля, болей в теле, ринореи, одышки, пневмонии и бронхита.

48. Способ по п. 46 или п. 47, где указанную фармацевтическую композицию вводят указанному субъекту с профилактической целью.

49. Способ по любому из пп. 46—48, где указанный субъект выбран из группы, состоящей из индивидуума с ослабленным иммунитетом, взрослого в возрасте 65 лет или старше, работника сферы здравоохранения и человека с наличием проблем медицинского характера в анамнезе или основного патологического состояния.

50. Способ по п. 49, где указанное основное патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из проблемы со стороны сердца и диабета.

51. Способ по любому из пп. 46—50, где указанную фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

52. Способ по п. 51, где указанное второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела, которое специфически связывается с НА вируса гриппа, вакцины против вируса гриппа, пищевой добавки и другого средства паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

53. Способ по п. 52, где указанное противовоспалительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств.

54. Способ по п. 53, где указанная пищевая добавка представляет собой антиоксидант.

55. Способ по любому из пп. 51—54, где указанное второе терапевтическое средство вводят посредством пути введения, являющегося отличным от такового для указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

56. Способ по любому из пп. 51—55, где указанное второе терапевтическое средство вводят перорально.

57. Способ по п. 52, где указанное противовирусное лекарственное средство представляет собой осельтамивир.

58. Способ по п. 57, где указанный осельтамивир вводят до введения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

59. Способ по п. 57, где указанный осельтамивир вводят параллельно с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

60. Способ по п. 57, где указанный осельтамивир вводят после введения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

61. Способ по п. 52, где указанное противовирусное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против вируса гриппа А.

62. Способ по п. 61, где указанное лекарственное средство против вируса гриппа А представляет собой антитело.

63. Способ по п. 62, где указанное антитело специфически связывается с НА вируса гриппа А.

64. Способ по любому из пп. 46—63, где указанную фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутривожно, внутримышечно, интраназально или перорально.