(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 042611 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.06

(21) Номер заявки
201990988

(22) Дата подачи заявки
2017.10.19

(51) Int. Cl. *C07K 16/10* (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CHIKV И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **16306374.6**
(32) **2016.10.20**
(33) **EP**
(43) **2019.09.30**
(86) **PCT/EP2017/076792**
(87) **WO 2018/073387 2018.04.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
Картер Кара (US), Лемуан Сендрин, Мандрон Мари (FR), Парк Сунгхае, Цю Хуавэй, Ротблетт Джонатан (US)

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

(56) SCOTT A. SMITH ET AL: "Isolation and Characterization of Broad and Ultrapotent Human Monoclonal Antibodies with Therapeutic Activity against Chikungunya Virus", CELL HOST & MICROBE, vol. 18, no. 1, 1 July 2015 (2015-07-01), pages 86-95, XP055366264, NL ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2015.06.009 the whole document, in particular table 1 and figure 3

WO-A1-2015010125

L. WARTER ET AL: "Chikungunya Virus Envelope-Specific Human Monoclonal Antibodies with Broad Neutralization Potency", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 186, no. 5, 28 January 2011 (2011-01-28), pages 3258-3264, XP055082407, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1003139 the whole document, in particular discussion and figures 3-5 and tablis I and II

GESTUR VIDARSSON ET AL: "IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 20 October 2014 (2014-10-20), XP055166978, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00520 the whole document, in particular table 1; page 4, left-hand column, first paragraph-page 5, left-hand column, paragraph 1; figure 3; page 10, left-hand column, second paragraph - right-hand column, third paragraph

WO-A1-2012106578

US-A1-2009041770

STROHL ET AL: "Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 20, no. 6, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 685-691, XP026778879, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/J.COPBIO.2009.10.011 [retrieved on 2009-11-04] the whole document, in particular page 688, right-hand column, bridging paragraph to page 689; table 3

WO-A2-2013011076

(57) Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с вирусом чикунгуньи (CHIKV) и нейтрализуют его и которые сконструированы для получения терапевтических средств для лечения заболевания, вызываемого CHIKV, или предупреждения инфекции, вызываемой CHIKV. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по настоящему изобретению, и применению антител для предупреждения и лечения заболевания, вызываемого CHIKV.

042611 B1

042611 B1

Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с вирусом чикунгуньи (CHIKV) и нейтрализуют его и которые сконструированы для получения растворов профилактического и терапевтического действия для предупреждения и лечения заболевания, вызываемого CHIKV. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим нейтрализующие антитела к CHIKV, и применению антител для предупреждения и лечения заболевания, вызываемого CHIKV.

CHIKV представляет собой переносимый комарами патоген, вызывающий повторно возникающую инфекцию. CHIKV является эндемическим в Африке, Индии и Юго-Восточной Азии, однако его непредсказуемые и крупные вспышки также случаются с высокой частотой поражений за пределами этих регионов, вызывая инфицирование миллионов людей (Powers AM, Logue CH, 2007, J. Gen. Virol. 88:2363-2377). Мутация в гликопротеине 1 (E1) оболочки CHIKV обеспечила возможность передачи вируса комарами Aedes albopictus, в дополнение к комарам Aedes aegypti, что привело в 2005 году к обширным и серьезным эпидемиям в Реюньоне, Индии и Индонезии с последующими вспышками, вызванными передвижением туристов, происходящими в Италии, Франции и Китае (Tsetsarkin KA et al 2007, PLoS Pathog. 3:e201; Schuffenecker I et al 2006, PLoS Med. 3: e263; Wu D, Zhang Y et al 2013, Virol. J. 10: 174; Rezza G et al 2007, Lancet 370: 1840-1846; Burt FJ 2012, Lancet 379: 662-671). Ввиду расширенного географического ареала комаров Aedes albopictus ожидается, что вирус распространится на новые территории, и в настоящее время в Европе и Северной и Южной Америке существует риск вспышек CHIKV.

CHIKV представляет собой оболочечный вирус с геномом, представленным положительной нитью РНК, относящийся к роду альфа-вирусов семейства Togaviridae. Он является представителем серокомплекса вируса леса Семлики и близкородственен вирусу реки Росс и вирусу о'Нъонг-нъонг (ONNV); поскольку он передается членистоногими, а именно комарами, его также можно отнести к арбовирусу (вирусу, переносимому членистоногими).

CHIKV проникает в клетки посредством рецептор-опосредованной интернализации и события слияния мембран II типа при низком pH в ранних эндосомах. Заболевание, вызываемое CHIKV, характеризуется острой фазой, фазой после купирования острых симптомов и хронической фазой полиартрита/полиартралгии, последняя из которых обычно симметрична и часто приводит к потере трудоспособности и может длиться месяцами или годами. Во время острой фазы также присутствуют другие симптомы, такие как лихорадка, сыпь, миалгия и/или усталость. Недавняя эпидемия была также связана с атипичными и тяжелыми клиническими формами заболевания, вызываемого CHIKV, и несколькими летальными исходами, которые, по-видимому, ограничивались случаями очень молодых и пожилых пациентов с сопутствующими заболеваниями.

В настоящее время нет конкретных профилактических или терапевтических средств для лечения заболевания, вызываемого CHIKV. CHIKV лечат симптоматически, обычно с соблюдением постельного режима, обильного питья и приема лекарственных препаратов для облегчения симптомов лихорадки и болеутоляющих, таких как простые анальгетики и/или нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID). Хотя кандидатная вакцина против CHIKV была впервые предложена 45 лет назад, многие протестированные на сегодняшний день кандидатные вакцины не смогли вызвать выработку защитных антител или продемонстрировали значительные проблемы с безопасностью.

Все еще существует потребность в средствах для лечения, демонстрирующих повышенную терапевтическую эффективность в отношении CHIKV, включая применение специфических моноклональных антител, нацеливающихся на CHIKV.

В данной области техники существует потребность в нейтрализующих антителах к CHIKV, подходящих для профилактических и терапевтических путей применения. В частности, такие антитела должны надлежащим образом нейтрализовать различные штаммы вируса CHIK с высокой аффинностью связывания с мишенью, демонстрировать соответствующие фармакокинетические параметры, проявлять соответствующий период полужизни при введении и обеспечивать возможность эффективного крупномасштабного производства, при этом с сохранением их связывания с FcγRIIIa, которое ассоциировано с эффекторными функциями.

Краткое описание изобретения

Как раскрыто в настоящем изобретении, авторы настоящей заявки смогли выбрать и сконструировать специфические нейтрализующие антитела к CHIKV, улучшенные по их фармакокинетическим характеристикам, связанным с воздействием, и сохранению их связывания с FcγRIIIa, которое ассоциировано с эффекторными функциями, что делает их соответствующими для разработки терапевтических средств для предупреждения и лечения заболевания, вызываемого CHIKV, и удовлетворяет потребность в данной области техники в эффективных средствах терапии против CHIKV.

Антитела по настоящему изобретению характеризуются высокой аффинностью связывания (в наномолярном диапазоне) в отношении различных штаммов CHIKV. Следовательно, они проявляют обширную и чрезвычайно сильную нейтрализующую активность в отношении различных штаммов CHIKV. Кроме того, антитела по настоящему изобретению характеризуются улучшенным связыванием с рецептором FcRn человека с сохранением при этом связывания FcγRIIIa, что обеспечивает их соответствую-

щий увеличенный период полужизни с сохранением при этом их связывания с FcγRIIIa, которое ассоциировано с эффекторными функциями.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, которое связывается с CHIKV и которое содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), где

i. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10, или

ii. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16, или

iii. указанные CDRH и CDRLH имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей, указанных в i или ii, одной или двумя аминокислотными заменами;

и где указанное антитело дополнительно содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

iv. аланина в положении 434, или

v. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

vi. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

vii. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

viii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело связывается с CHIKV и содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), где

i. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10, или

ii. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16, или

iii. указанные CDRH и CDRLH имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей, указанных в i или ii, одной или двумя аминокислотными заменами;

и где указанное антитело дополнительно содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

iv. аланина в положении 434, или

v. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

vi. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

vii. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

viii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом;

и где антитело характеризуется одним или несколькими из следующих свойств:

ix. связывает мишень pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (K_D), составляющей менее приблизительно 10 нМ,

x. связывает FcRn человека с K_D, составляющей менее приблизительно 200 нМ,

xi. связывает FcγRIII человека с K_D, составляющей менее приблизительно 600 нМ.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и при этом указанное антитело содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 5;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 6;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 7;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 8;

CDRL2, состоящую из последовательности GNT;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 10.

В дополнительном варианте осуществления моноклональное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и при этом указанное антитело содер-

жит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 13;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит Fc-область, которая содержит остатки, выбранные из группы, состоящей из

i. лейцина в положении 428 и серина в положении 434, или

ii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В дополнительном варианте осуществления моноклональное антитело содержит Fc-область, где указанная Fc-область содержит лейцин в положении 428 и серин в положении 434, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит легкую каппа-цепь или легкую лямбда-цепь.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет Fc-область, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 и 63, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 1, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 2, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет тяжелую цепь, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 31, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет легкую цепь, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 20, или состоит из нее.

Во втором аспекте представлено выделенное моноклональное антитело, связывающееся с CHIKV, или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и/или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и/или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 33;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и/или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и/или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие амино-

кислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно, и указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G,

и где антитело характеризуется одним или несколькими из следующих свойств:

iv. связывает мишень pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (KD), составляющей менее приблизительно 10 нМ,

v. связывает FcRn человека с K_D, составляющей менее приблизительно 200 нМ,

vi. связывает FcγRIII человека с K_D, составляющей менее приблизительно 600 нМ.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит аминокислоту в положении 8 в SEQ ID NO: 33, выбранную из группы, состоящей из I, L, V, Q и N.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 34;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит аминокислоту в положении 12 в SEQ ID NO: 33, выбранную из группы, состоящей из Q, E, S, T и D.

В дополнительном варианте осуществления моноклональное антитело содержит:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 35;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело содержит аминокислоту в положении 13 в SEQ ID NO: 33, выбранную из группы, состоящей из A, S и T.

В дополнительном варианте осуществления моноклональное антитело содержит:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 36;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 57, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 4, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет свою тяжелую цепь, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 47, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет легкую цепь, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 38, или состоит из нее.

В другом аспекте данного второго аспекта моноклональное антитело дополнительно содержит Fc-область, которая содержит остатки, выбранные из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и

глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет Fc-область, которая содержит остатки, выбранные из группы, состоящей из

i. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 или

ii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет Fc-область, которая содержит лейцин в положении 428 и серин в положении 434, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления данного аспекта настоящего изобретения моноклональное антитело содержит легкую каппа-цепь или легкую лямбда-цепь.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет Fc-область, содержащую последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 и 63, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 57, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 4, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет тяжелую цепь, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 53, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело имеет легкую цепь, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью под ID NO: 38, или состоит из нее.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к моноклональному антителу для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом варианте осуществления моноклональное предназначено для применения в лечении артралгии, ассоциированной с CHIKV.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело предназначено для применения в предупреждении инфекции, вызываемой CHIKV.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит моноклональное антитело и по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к линии клеток, продуцирующей моноклональное антитело.

В седьмом аспекте представлен способ получения моноклонального антитела, где указанный способ включает стадии

(i) культивирования линии клеток в соответствии с шестым аспектом,

(ii) очистки полученного моноклонального антитела, и необязательно

(iii) составления указанного моноклонального антитела в фармацевтическую композицию.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе. В одном варианте осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, характеризующийся по меньшей мере 80% идентичностью с одной из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54. В одном варианте осуществления полинуклеотид характеризуется тем, что он имеет последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с одной из последовательностей под SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему по меньшей мере одно антитело, предусмотренное в данном документе. В одном варианте осуществления указанный набор необязательно содержит упаковочный материал.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - аминокислотная последовательность CH1, шарнирной, CH2- и CH3-областей тяжелой цепи IgG1 человека; часть шарнирной области, а также CH2 и CH3-области составляют Fc-область. Нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, как изложено в Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th, Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Замещенные остатки в Fc-области, предусмотренные в настоящем изобретении, заключены в квадрат.

Фиг. 2 - выравнивание последовательностей Fc-области IgG1: SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

Фиг. 3 - влияние мутаций в CDRH3 mAb2, созданных для устранения потенциальных мотивов дезаминирования и окисления, на связывание мишени E2-E1. Сравнительные результаты показаны в двух повторностях для каждого мутанта.

Фиг. 4 - влияние замен в Fc-областях mAb1 и mAb2 соответственно на связывание FcRn. Сравнительные результаты в отношении FcRn человека для mAb1 (фиг. 4A) и mAb2 (фиг. 4C) и в отношении FcRn мыши для mAb1 (фиг. 4B) и mAb2 (фиг. 4D) при pH 6,0 показаны в двух повторностях.

Фиг. 5 - влияние мутаций в Fc-областях mAb1 и mAb2 соответственно на связывание мишени E2-E1. Результаты в отношении антигена E1-E2, полученного из штаммов LR2006 (фиг. 5A) и SL15649 (фиг. 5B) соответственно, показаны в двух повторностях.

Фиг. 6 - влияние замен в Fc-областях mAb1 и mAb2 соответственно на связывание FcγRIIIa. Результаты связывания в отношении высокоаффинного рецептора FcγRIIIa человека (FcγRIIIaV158) для mAb1 (фиг. 6A) и для mAb2 (фиг. 6B), а также в отношении низкоаффинного рецептора FcγRIIIa человека (FcγRIIIaF158) соответственно (фиг. 6C для mAb1, а фиг. 6D для mAb2) показаны в двух повторностях.

Фиг. 7 - нейтрализующая активность mAb1 и mAb7 с применением стандартного анализа снижения бляшкообразования. MAb1 и mAb7 ингибируют вирусы чикунгуньи всех трех генотипов, т.е. азиатского (фиг. 7A), восточно-центрального и южноафриканского (фиг. 7B) и западноафриканского (фиг. 7C), с чрезвычайно сильной активностью.

Фиг. 8 - исследования по профилактике посредством mab у мышей. Влияние mAb1 и mAb7, вводимых в дозе 250 мкг/мышь за 2, 7 или 14 дней до инфицирования CHIKV, на титр вируса через 3 дня после инокуляции в правую заднюю конечность мышей DBA/1J. Титр вируса представлен на графике в виде 50% инфицирующей дозы для культуры клеток ($CCID_{50}$) на грамм ткани.

Фиг. 9 - терапия посредством mAb после воздействия возбудителя у мышей. Титр вируса в правой задней конечности через 5 дней после инокуляции (dpi) после однократного внутрибрюшинного введения фиксированной дозы 250 мкг mAb 2, 7, 11 и 14 через 3 dpi (фиг. 9A). Влияние диапазона доз на титр вируса в правой задней конечности через 5 dpi mAb7 и mAb14 после однократного введения различных доз (от 10 до 250 мкг/мышь) через 3 dpi (фиг. 9B). Титр вируса представлен на графике в виде 50% инфицирующей дозы для культуры клеток ($CCID_{50}$) на грамм ткани. Верхняя пунктирная линия представляет собой средний предел обнаружения для гомогенатов тканей.

Фиг. 10 - фармакокинетические характеристики mab у приматов, отличных от человека. Сравнение фармакокинетических характеристик mAb1 и mAb7, вводимых внутривенно (IV) болюсно в дозе 2,5 мг/кг самцу макака-крабоеда (Macaca fascicularis).

Подробное описание изобретения

Определения.

"Антитело" может представлять собой природное или традиционное антитело, в котором две тяжелые цепи соединены друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь соединена с легкой цепью дисульфидной связью. У млекопитающих антитела подразделяют на пять основных классов или изотипов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Их классифицируют в соответствии с тем, какую тяжелую цепь они содержат, альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю соответственно. Они отличаются последовательностью и числом константных доменов, структурой шарнира и валентностью антитела. Существует два типа легких цепей, лямбда (l) и каппа (k), при этом легкие каппа-цепи являются более распространенными из двух данных типов. Хотя они относительно различаются по последовательности белка, они имеют сходную структуру и функцию.

Пять основных классов тяжелых цепей (или изотипов) определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит домены с отличающейся последовательностью. IgG является наиболее распространенным антителом в нормальной сыворотке крови человека, составляя 70-85% от общего пула иммуноглобулинов. Он является мономерным, имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 150 кДа, представляет собой основное антитело вторичного иммунного ответа и характеризуется наиболее длительным периодом полужизни среди пяти классов иммуноглобулинов. IgG включает четыре подкласса иммуноглобулинов человека (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), каждый из которых содержит отличающуюся тяжелую цепь. Они являются высокогомологичными и отличаются в основном по шарнирной области и степени, с которой они активируют иммунную систему хозяина. IgG1 и IgG4 содержат две межцепочечные дисульфидные связи в шарнирной области, IgG2 имеет 4, а IgG3 имеет 11.

Легкая цепь содержит два домена или области, вариабельный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь содержит четыре домена, вариабельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, совместно именуемых CH). Вариабельные области как легких (VL), так и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание при связывании и специфичность к антигену. Домены константных областей легких (CL) и тяжелых (CH) цепей придают важные биологические свойства, такие как объединение цепей антитела, секреция, перемещение через плаценту, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из вариабельных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между паратопом антитела и антигенной детерминантой. Паратопы антител образованы остатками главным образом из гипервариабельных или определяющих комплементарность областей (CDR). Остатки из негипервариабельных или каркасных областей (FR) иногда влияют на общую структуру домена и, следовательно, паратоп. "Определяющие комплементарность области" или "CDR" относятся к аминокислотным последовательностям, которые совместно определяют аффинность связывания и специфичность природной Fv-области нативного связывающего участка иммуноглобулина. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина имеет три CDR, обозначенные соответственно CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L или CDRL1, CDRL2, CDRL3 (для определяющих комплементарность областей легкой цепи) и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H или CDRH1, CDRH2, CDRH3 (для определяющих комплементарность областей тяжелой цепи). Следовательно, антигенсвязывающий участок традиционного антитела содержит шесть CDR, которые включают набор CDR из каждой из V-областей тяжелой и легкой цепей.

"Каркасными областями" (FR) называют аминокислотные последовательности, расположенные между CDR, т.е. те части вариабельных областей легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, которые являются относительно консервативными среди различных иммуноглобулинов у одного вида. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина имеет четыре FR, обозначенные соответственно как FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Как используется в данном документе, "каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая практически идентична (на приблизительно 85% или больше, в частности на 90, 95, 97, 99 или 100%) каркасной области встречающегося в природе антитела человека.

В одном варианте осуществления определение CDR/FR в легкой или тяжелой цепях иммуноглобулина следует давать на основании определения по IMGT (Lefranc, M.P. et al., 2003, Dev Comp Immunol. 27(1): 55-77; www.imqt.orq). Последовательности CDR, предусмотренные в настоящем изобретении, приведены в соответствии с номенклатурой IMGT.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к традиционным или полноразмерным антителам (т.е. антителам, содержащим две тяжелые цепи и две легкие цепи), к однодоменным антителам и к фрагментам традиционных и однодоменных антител. Используемый в данном документе термин "антитело" включает без ограничения химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека и полиспецифические антитела (такие как, например, биспецифические и триспецифические антитела). Термин "антитело" относится как к антителу, содержащему сигнальный пептид (или пропептид, если таковой имеется), так и к зрелой форме, получаемой при секреции и протеолитической обработке цепи (цепей).

Как используется в данном документе, антитело или иммуноглобулин также включают "однодоменные антитела", которые были описаны совсем недавно и которые представляют собой антитела, у которых определяющие комплементарность области являются частью однодоменного полипептида. Примеры однодоменных антител включают антитела, состоящие только из тяжелых цепей, антитела, в естественных условиях не имеющие легких цепей, однодоменные антитела, полученные из традиционных антител с четырьмя цепями, сконструированные однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены из любого вида, в том числе, без ограничения, мыши, человека, верблюда, ламы, козы, кролика и крупного рогатого скота. Однодоменные антитела могут представлять собой встречающиеся в природе однодоменные антитела, известные как антитела, состоящие только из тяжелых цепей, не имеющие легких цепей. В частности, виды семейства Camelidae, например, верблюд, дромедар, лама, альпака и гуанако, вырабатывают антитела, состоящие только из тяжелых цепей, в естественных услови-

ях не имеющие легких цепей. У антител верблюдовых, состоящих только из тяжелых цепей, также отсутствует домен CH1.

Вариабельная область тяжелой цепи этих однодоменных антител, не имеющих легких цепей, известна из уровня техники как "VHH" или "нанотело". Подобно традиционным VH-доменам, VHH содержат четыре FR и три CDR. Нанотела обладают преимуществами по сравнению с традиционными антителами: они приблизительно в десять раз меньше, чем молекулы IgG, и, как следствие, правильно свернутые функциональные нанотела можно получать посредством экспрессии in vitro при достижении высокого выхода. Кроме того, нанотела являются очень стабильными и устойчивыми к действию протеаз. Обзор свойств и получения нанотел был приведен в Harmsen and De Haard HJ (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov; 77 (1): 13-22).

Как используется в данном документе, "выделенное антитело" относится к антителу, которое в основном не содержит других антител, специфичных в отношении другого антигена; например, выделенное антитело, которое связывается с CHIKV, или его фрагмент, или его антигенсвязывающий фрагмент в основном не содержат антител, которые специфически связывают антигены, отличные от CHIKV.

"Блокирующее антитело", или "нейтрализующее антитело", или "антитело, которое нейтрализует активность CHIKV", или "антитело, которое демонстрирует/проявляет нейтрализующую активность в отношении CHIKV", или "антитело, нейтрализующее CHIKV", или "антитело к CHIKV", как используется в данном документе, относятся к антителу, связывание которого с CHIKV приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности CHIKV. Например, антитело может нейтрализовать штамм CHIKV путем блокирования прикрепления CHIKV к клеткам, и тем самым предотвращать инфицирование указанных клеток CHIKV.

Термин "моноклональное антитело" или "mAb", используемый в данном документе, относится к молекуле антитела единого аминокислотного состава, которая нацеливается на конкретный антиген, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела любым конкретным способом. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона B-клеток или гибридомы, но также может быть рекомбинантным, т.е. полученным с помощью белковой инженерии.

Термин "химерное антитело" относится к сконструированному антителу, которое в своем наиболее широком смысле содержит одну или несколько областей из одного антитела и одну или несколько областей из одного или нескольких других антител. В частности, химерное антитело содержит VH-домен и VL-домен антитела, полученного из отличного от человека животного, совместно с CH-доменом и CL-доменом другого антитела, в частности, антитела человека. В качестве отличного от человека животного может использоваться любое животное, такое как мышь, крыса, хомячок, кролик и т.п. Химерное антитело также может означать полиспецифическое антитело, обладающее специфичностью в отношении по меньшей мере двух различных антигенов. В варианте осуществления химерное антитело имеет вариабельные домены, происходящие от мыши, и константные домены, происходящие от человека.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, изначально полностью или частично происходящему не от человека, которое было модифицировано с заменой определенных аминокислот, в частности, в каркасных областях тяжелой и легкой цепей, во избежание или в целях минимизации иммунного ответа у людей. Константные домены гуманизированного антитела в большинстве случаев представляют собой CH- и CL-домены человека. В варианте осуществления гуманизированное антитело имеет константные домены, происходящие от человека.

"Фрагменты" (традиционных) антител содержат часть интактного антитела, в частности, антигенсвязывающую область или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, диатела, биспецифические и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагмент традиционного антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело, состоящее только из тяжелых цепей или VHH.

Термин "Fab" означает фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу, составляющую приблизительно 50000, и антигенсвязывающую активность, в котором, среди фрагментов, получаемых путем обработки IgG протеазой папаином, приблизительно половина N-концевой части H-цепи и вся L-цепь связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи.

Термин "F(ab')2" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу, составляющую приблизительно 100000, и антигенсвязывающую активность, который, среди фрагментов, получаемых путем обработки IgG протеазой пепсином, является немного большим, чем Fab, связанные с помощью дисульфидной связи шарнирной области.

Термин "Fab'" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу, составляющую приблизительно 50000, и антигенсвязывающую активность, который образуется путем разрезания дисульфидной связи шарнирной области F(ab')2.

"Fc-область" или "Fc-домен" определяется как карбоксильный конец тяжелых цепей антител и содержит белковые последовательности, общие для всех иммуноглобулинов, а также детерминанты, уникальные для отдельных различных классов иммуноглобулинов. В качестве примера тяжелая цепь IgG1 человека содержит CH1-, шарнирную, CH2- и CH3-области; при этом часть шарнира, а также CH2- и

CH3-области составляют Fc-область. Как показано на фиг. 1, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области для цели настоящего изобретения соответствует EU-индексу, как изложено в Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th, Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Следовательно, выражение "где указанные аминокислотные положения приведены в соответствии с EU-индексом" относится к данной нумерации Fc-области, как указано выше в Kabat et al, 1991 и как показано на фиг. 1.

Домены данной Fc-области играют центральную роль в определении биологических функций иммуноглобулина, и данные биологические функции называются "эффекторными функциями". Данные опосредуемые Fc-доменом виды активности опосредуются иммунологическими эффекторными клетками, в том числе B-лимфоцитами, естественными клетками-киллерами, макрофагами, базофилами, нейтрофилами и тучными клетками или различными компонентами системы комплемента. Такие эффекторные функции включают активацию рецепторов на поверхности указанных эффекторных клеток посредством связывания Fc-домена антитела с указанным рецептором (или "Fc-рецептором") или с компонентом (компонентами) системы комплемента. Виды активности, представляющие собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), относятся к данным эффекторным функциям и включают связывание Fc-домена с Fc-рецепторами, такими как FcγRI (CD64), FcγRII, FcγRIII, эффекторных клеток или с компонентами комплемента, такими как C1q. Из различных классов иммуноглобулинов человека IgG1 и IgG3 человека опосредуют ADCC более эффективно, чем IgG2 и IgG4. Термин "Fc-рецептор" включает без ограничения FcγRI (CD64), FcγRIIA и FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a) и FcγRIIIB (CD16b), Fcα-рецептор (FcαRI или CD89) и Fcε-рецептор (FcεRI и FcεRII (CD23)). В литературе сообщалось, что некоторые аминокислотные замены приводят к снижению эффекторных функций в различных изотипах IgG человека (см. табл. 2 в Strohl 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691).

Одноцепочечный полипептид Fv ("scFv") представляет собой соединенный ковалентными связями гетеродимер VH::VL, который обычно экспрессируется продуктом генного слияния, содержащим гены, кодирующие VH и VL, соединенные линкером, кодирующим пептид. scFv-фрагмент человека может содержать CDR, удерживаемые в надлежащей конформации, в частности, путем применения методик рекомбинации генов. Бивалентные и поливалентные фрагменты антител могут образовываться самопроизвольно путем объединения моновалентных scFv, либо их можно получать путем соединения моновалентных scFv пептидным линкером, как, например, в случае бивалентного sc(Fv)2. "dsFv" представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный дисульфидной связью. "(dsFv)2" обозначает два dsFv, соединенных пептидным линкером.

Термин "биспецифическое антитело" или "BsAb" означает антитело, в котором антигенсвязывающие участки двух антител объединены в одной молекуле. Таким образом, BsAb способны связываться с двумя различными антигенами одновременно. Для разработки, модификации и получения антител или производных антител с необходимым набором свойств связывания и эффекторных функций все чаще используют генную инженерию, как описано, например, в EP 2050764 A1.

Термин "полиспецифическое антитело" означает антитело, в котором антигенсвязывающие участки двух или более антител объединены в одной молекуле.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, при этом данные фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в составе одной полипептидной цепи (VH-VL). Вследствие применения линкера, слишком короткого для обеспечения спаривания между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих участка.

Термин "гибридома" означает клетку, которую получают путем слияния B-клетки, полученной при иммунизации отличного от человека млекопитающего антигеном, с клеткой миеломы, полученной от мыши и т.п., которая продуцирует необходимое моноклональное антитело, характеризующееся специфичностью к антигену.

Используемые в данном документе выражения "специфически связывает", или "специфически связывается с", или "связывается с." или т.п. означают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно устойчивым в физиологических условиях.

Специфическое связывание может быть охарактеризовано с помощью равновесной константы диссоциации (K_D), составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} M или меньше (например, меньшее значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения наличия специфического связывания двух молекул хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано в данном документе, антитела характеризовали, например, по их специфическому связыванию с CHIKV и/или антигеном CHIKV с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Как используется в данном документе, "антиген CHIKV" означает специфические природные анти-

гены для антител, описанных в данном документе, т.е. белок E2 CHIKV. Он также охватывает рекомбинантные белки, которые содержат белки оболочки E1 CHIKV и специфический антиген E2 CHIKV, используемые, например, в экспериментах по связыванию на основе поверхностного плазмонного резонанса для измерения значений аффинности связывания антител к CHIKV in vitro, описанные в данном документе в разделе "Материалы и способы" и обозначенные как "белок pE2-E1", или "мишень pE2-E1", или "p62-E1", или "his-меченый E2 CHIKV", или "мишень pE2-E1 CHIKV", или "антиген pE2-E1 CHIKV".

Как используется в данном документе, "кислая среда" означает среду со значением pH менее 7; при этом следует понимать, что эксперименты по связыванию, проводимые, например, при pH 6, приводят к данным по связыванию в кислой среде.

Последовательность, которая "на по меньшей мере 80% идентична эталонной последовательности" представляет собой последовательность, характеризующуюся по своей полной длине 80% или более, в частности 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с полной длиной эталонной последовательности.

Процентное значение "идентичности последовательностей" можно определить путем сравнения двух последовательностей, оптимальным образом выровненных в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентное значение рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречается идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток, с получением количества положений с совпадениями, деления количества положений с совпадениями на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения проводят путем глобального попарного выравнивания, например, с помощью алгоритма Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970). Процентное значение идентичности последовательностей можно без труда определить, например, с использованием программы Needle с помощью матрицы BLOSUM62 и следующих параметров: штраф за открытие гэпа=10, штраф за расширение гэпа=0,5.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, содержащим R-группу боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. 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) амидосодержащие 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: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и

7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Группы консервативных замен аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин-триптофан, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

Термины "антигенсвязывающая часть " антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методик генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела или "фрагмент антитела", используемые в данном документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с CHIKV и/или антигеном CHIKV. Такие антигенсвязывающие части обычно содержат CDR антитела.

"Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые антитела, связавшиеся с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, естественных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяют этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с целевой клеткой, несущей антиген, и затем уничтожать целевую клетку. Иными словами, ADCC представляет собой механизм клеточного иммунитета, посредством которого эффекторные клетки иммунной системы, в основном естественные клетки-киллеры, активно лизируют целевую клетку, которая была связана специфическими антителами. ADCC является одним из механизмов, посредством которого антитела, являющиеся частью гуморального иммунного ответа, могут ограничивать и сдерживать инфекции. Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы также рассматривали анализ ADCC in vitro, такой как описанный в патенте США № 5500362 или 5821337.

Выражение "аминокислотная (аминокислотные) последовательность (последовательности), которая (которые) отличается (отличаются) от последовательностей X или Y одной или двумя аминокислотными заменами" означает, что указанная последовательность отличается от последовательностей X или Y не

более чем двумя аминокислотными заменами, т.е. отличается только одной или двумя аминокислотными заменами.

Например, выражение "последовательность X, которая отличается от последовательности Y аминокислотной заменой Z и необязательно одной или двумя дополнительными аминокислотными заменами" означает, что указанная последовательность X отличается от последовательности Y:

только аминокислотной заменой Z или

аминокислотной заменой Z и одной или двумя аминокислотными заменами, которая (которые) отличаются от аминокислотной замены Z.

Выражение "SEQ ID NO: X с одной аминокислотной заменой в положении Y" означает последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: X одной аминокислотной заменой в положении Y SEQ ID NO: X.

Как используется в данном документе, "CHIKV" означает вирус чикунгуньи, который представляет собой оболочечный вирус с геномом, представленным положительной нитью РНК, относящийся к роду альфа-вирусов семейства Togaviridae, как описано выше во вводной части. CHIKV также включает различные репрезентативные инфекционные штаммы ("штаммы CHIKV"), в том числе без ограничения генотип Восточной/Центральной/Южной Африки (ECSA), такой как штамм LR2006 OPY1 [LR], например, имеющий последовательность, показанную под номером доступа в NCBI: DQ443544.2, от 24 октября 2006 г.; западноафриканский генотип, такой как штамм NI 64 IbH35 в качестве другого примера, имеющий последовательность, показанную под номером доступа в NCBI: HM045786.1, от 28 декабря 2010 г.; и азиатский генотип, такой как штамм RSU1 в качестве другого примера, имеющий последовательность, показанную под номером доступа в NCBI: HM045797.1, от 28 декабря 2010 г., и штаммы 99659 [2014, Карибский бассейн], например, имеющие последовательность, показанную под номером доступа в NCBI: KJ451624, от 11 сентября 2 014 г. Были идентифицированы другие штаммы, принадлежащие к различным генотипам, такие как штамм S27 в качестве другого примера, имеющий последовательность, показанную под номером доступа в NCBI: AF369024.2, от 14 января 2014 г., и под ссылкой в UniProtKB/Swiss-Prot: Q8JUX5 от 16 сентября 2015 г., а также SL15649 в качестве другого примера с последовательностью, показанной под номером доступа в NCBI: GU189061, от 14 декабря 2011 г. Другие примеры находимых по ссылке штаммов CHIKV доступны в базе данных Virus Pathogen, в отношении их геномов по адресу: https://www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?method=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=14763623224 48, или в отношении ассоциированных белков по адресу: https://www.viprbrc.org/brc/vipr_protein_search.spg?method=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=1476362669 763.

Подобно геному других альфа-вирусов, геном CHIKV кодирует два гликопротеина оболочки E2 и E1, которые образуются из более крупного полипротеина-предшественника (капсид/E3/E2/6K/E1; показан под номером доступа в NCBI: NC 004162.2, от 27 июня 2012 г.) и встраиваются в вирусную мембрану. Зрелый вирион состоит из трех основных структурных белков: нуклеокапсидного белка и двух гликопротеинов E1 и E2, где функция E2 состоит в прикреплении к клеткам, а E1 участвует в слиянии вируса. Третий гликопротеин E3 связан со зрелыми вирионами в некоторых альфа-вирусах, но не во всех, тогда как белок 6K, мембранно-связанный пептид, созданный путем расщепления полипротеина-предшественника с высвобождением E2 и E1, включается в частицы на низком уровне. Строение поверхностных гликопротеинов альфа-вируса в частицах определяли с помощью криоэлектронной микроскопии (Cryo-EM), тогда как атомная структура гликопротеина CHIKV была недавно решена с помощью рентгеновской кристаллографии как для зрелых частиц, так и для незрелого полипротеина-предшественника. По 240 копий каждого из трех гликопротеинов (E3/E2/E1) объединяются с образованием 80 шиповидных отростков на зрелом вирусе, которые составляют икосаэдрическую белковую оболочку, окружающую вирусную мембрану. (Voss JE et al 2010, Nature 468: 709-712). Сворачивание, транспортировка на поверхность и функции этих гликопротеинов зависят от их правильных взаимодействий друг с другом. E1 состоит из трех доменов B-листа, называемых I, II и III; E2 содержит три иммуноглобулиноподобных домена (A, B и C, где A находится на N-конце). В комплексе домен B лежит на дальнем конце мембраны и вступает в контакт с E3, домен C находится наиболее близко к вирусной мембране, а домен A находится в центре (Fox JM et al 2015, Cell 163: 1095-1107 и WO 2015010125). Последовательности и информация в отношении белков El, E2 и E3 CHIKV представлены в качестве неограничивающих примеров под № записей в PDB 2xFB и 2xFC (последнее обновление 24 ноября 2010 г.), под № записей в PDB 3N40, 3N41, 3N42, 3N43 и 3N44 (последнее обновление 01 декабря 2010 г.) соответственно.

Антитела, предусмотренные в настоящем изобретении.

Для терапевтических целей желательно создать mAb, которые соответствуют в большей мере требуемым от них фармацевтическим свойствам за счет улучшения, в частности, их связывания с антигеном (антигенами), на который (которые) они нацеливаются, их стабильности, фармакокинетических характеристик и фармакодинамических характеристик, а также их функций.

В качестве первого объекта, в основе антител к CHIKV лежат полностью человеческие исходные антитела, mAb1 и mAb2 соответственно, которые характеризуются высокой аффинностью связывания (в пределах наномолярного диапазона) в отношении различных штаммов CHIKV и, в частности, их соот-

ветствующего белка E2. Следовательно, они проявляют обширную и чрезвычайно сильную нейтрализующую активность в отношении различных штаммов CHIKV.

MAb1 содержит:

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYSFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISTYKGYT**Q

YAQNFQGRVTITTDTPATTVYMELRSLRSDDTAVYYC**ARVLSETGYFYYYYYGMDV**WGQGTLVT

VSS

(SEQ ID NO: 1), где CDR показаны символами с полужирным начертанием, соответственно CDRH1 (GYSFTSYG, SEQ ID NO: 5), CDRH2 (ISTYKGYT, SEQ ID NO: 6) и CDRH3 (ARVLSETGYFYYYY-YGMDV, SEQ ID NO: 7). Каркасные области охватывают CDRH1, CDRH2 и CDRH3;

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

QAVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS**SSNIGADYN**VHWYQLLPGTAPKLLIY**GNT**NRPSG

VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSLSASV**FGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 2), где CDR показаны символами с полужирным начертанием,

соответственно CDRL1 (SSNIGADYN, SEQ ID NO: 8), CDRL2 (GNT) и CDRL3 (QSYDSSLSASV, SEQ ID NO: 10). Каркасные области охватывают CDRL1, CDRL2 и CDRL3;

Mab2 содержит:

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS**GYILSKLS**VHWVRQAPGKGLEWMGG**SEREDGET**V

YAQKFQGRISLTEDTSIETAYMELSSLSSEDTAVYYC**ATGGFWSMIGGNGVDY**WGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO:3), где CDR показаны символами с полужирным начертанием, соответственно CDRH1 (GYILSKLS, SEQ ID NO: 11), CDRH2 (SEREDGET, SEQ ID NO: 12) и CDRH3 (ATGGFWSMIGGNGVDY, SEQ ID NO: 13). Каркасные области охватывают CDRH1, CDRH2 и CDRH3;

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

QAVVTQSPSSLPASVGDRVTITCRAS**QDIRNN**LGWYQQKPGKAPERLIY**GTS**NLQSGVP

SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**LQHNSYPPT**FGRGTKVEIK

(SEQ ID NO: 4), где CDR показаны символами с полужирным начертанием, соответственно CDRL1 (QDIRNN, SEQ ID NO: 14), CDRL2 (GTS) и CDRL3 (LQHNSYPPT, SEQ ID NO: 16). Каркасные области охватывают CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает вариантные антитела mAb1 и mAb2, которые связываются с CHIKV и которые характеризуются улучшенным связыванием с рецептором FcRn в кислой среде, поскольку они содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в своем Fc-домене. Такие мутации приводят к увеличению периода полужизни в сыворотке крови таких вариантных антител при введении пациенту. Неограничивающие примеры таких замен включают, например, модификации в положениях 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 положениях 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положениях 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434, где указанные положения аминокислот приведены с применением нумерации в соответствии с EU-индексом (фиг. 1).

Авторы настоящего изобретения идентифицировали, как показано на фиг. 4 и в примере 2, что связывание с рецепторами FcRn человека и мыши при pH 6 увеличивалось при введении в Fc-область антител mAb1 или mAb2 замен, выбранных из нижеприведенной группы:

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256.

Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, как описано в примере 3 и на фиг. 5, что на связывание mAb1 и mAb2 с их мишенью pE2-E1 CHIKV не влияли замены, упомянутые выше, при введении в их Fc-область, и при этом они обеспечивали увеличение связывания с FcRn человека и мыши. Как показано в примере 2 и на фиг. 4, замены в Fc-области mAb1 или mAb2 демонстрируют наиболее сильное связывание FcRn человека и мыши, когда в их соответствующие Fc-области вводят тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256 соответственно или лейцин в положении положения 428 и серин в положении 434 соответственно.

Как известно в данной области техники, Fc-область важна для определения биологических функций иммуноглобулинов, называемых "эффекторными функциями". ADCC является одним из механизмов, частью клеточного иммунитета, посредством которого эффекторные клетки иммунной системы (в основном естественные клетки-киллеры) лизируют целевую клетку, которая была связана специфическими антителами. Следовательно, ADCC является одним из механизмов, который может ограничивать и сдер-

живать инфекции. Опосредованные клетками виды активности включают связывание Fc-домена с Fc-рецепторами, такими как FcγRI (CD64), FcγRII, FcγRIII эффекторных клеток.

Как предусмотрено в данном документе, где моноклональные антитела являются высокоспецифичными в отношении штаммов CHIKV и предназначены в терапевтических целях для лечения, их способность активировать ADCC является важным параметром для измерения, поскольку ADCC, по-видимому, соучаствует с активностью антител к CHIKV в контроле инфекционного заболевания. Как показано в примере 4 и на фиг. 6, авторы настоящего изобретения показали, что связывание mAb1 и mAb1 с FcγRIIIa сохранялось при введении в их соответствующую Fc-область замен, выбранных из нижеприведенной группы:

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно.

Напротив, связывание FcγRIIIa уменьшалось при осуществлении в mAb1 и mAb2 замен тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно.

Таким образом, авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела с улучшенным связыванием с рецептором FcRn человека с сохранением при этом связывания с FcγRIIIa, что обеспечивает соответствующий увеличенный период полужизни данных антител с сохранением при этом их эффекторных функций.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, которое связывается с CHIKV и которое содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), где

i. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10, или

ii. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16, или

iii. указанные CDRH и CDRLH имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей, указанных в i или ii, одной или двумя аминокислотными заменами,

и где указанное антитело дополнительно содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

Fc-области, содержащие такие замены, показаны на фиг. 1 и 2 (SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 59-63).

В одном варианте осуществления антитело к CHIKV содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере аланин в положении 434. В другом варианте осуществления антитело к CHIKV содержит Fc-область, содержащую аланин в положениях 307, 380 и 434. В другом варианте осуществления антитело к CHIKV содержит Fc-область, содержащую глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428. В другом варианте осуществления антитело к CHIKV содержит Fc-область, содержащую лейцин в положении 428 и серин в положении 434. В другом варианте осуществления антитело к CHIKV содержит Fc-область, содержащую тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256.

Антитела, предусмотренные в настоящем изобретении, получены из mAb1 или mAb2 и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие соответственно:

i. аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, или

ii. аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, или

iii. аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей, указанных в i или ii, одной или двумя аминокислотными заменами.

В дополнительном варианте осуществления антитела содержат CDR с аминокислотными последовательностями, которые отличаются одной или двумя аминокислотными заменами от последовательностей под SEQ ID NO: 5, 6 и 7 и аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, или одной или двумя аминокислотными заменами от последовательностей под SEQ ID NO: 11, 12 и 13 и под SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно.

Аминокислотная замена в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой кон-

сервативную или неконсервативную аминокислотную замену. Примеры консервативных замен приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Консервативные замены	Тип аминокислоты
Ala, Val, Leu, lle, Met, Phe, Trp, Tyr	Аминокислоты с алифатическими гидрофобными боковыми цепями
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Аминокислоты с незаряженными, но полярными боковыми цепями
Asp, Glu	Аминокислоты с кислотными боковыми цепями
Lys, Arg, His	Аминокислоты с основными боковыми цепями
Gly	Нейтральная боковая цепь

В другом варианте осуществления антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где указанное антитело содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления антитело получено из mAb2 и содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где указанное антитело содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb3) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последователь-

ности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере аланин в положении 434, где указанное положение аминокислоты приведено в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb4) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) , имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb5) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb7) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb6) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере тирозин в положении 2 52, треонин в положении 2 54 и глутаминовую кислоту в положении 256 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления вариантное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В дополнительном варианте осуществления вариантное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере аланин в положении 434, где указанное положение аминокислоты приведено в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb8) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и три определяющие комплементарность области лег-

кой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом дополнительном варианте осуществления вариантное антитело (mAb9) содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) , имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

Авторы настоящего изобретения показали, как описано в примере 3 и на фиг. 5, что на связывание mAb1 и mAb2 с их мишенью pE2-E1 CHIKV не оказывало влияние наличие Fc-области, содержащей по меньшей мере один остаток, упомянутый выше. Авторы настоящего изобретения также показали, что все из данных антител, содержащих Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, упомянутый выше, проявляют увеличенное связывание с FcRn человека и мыши (пример 2 и фиг. 4), что оказывает положительное влияние на их соответствующий период полужизни и, следовательно, является благоприятным для терапии против CHIKV; при этом наиболее высокое связывание FcRn у человека и мыши показано при введении в их соответствующую Fc-область либо тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно, либо лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно.

Следовательно, в иллюстративном варианте осуществления вариантное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, или Fc-область, содержащую по меньшей мере тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

Кроме того, как показано в примере 4 и на фиг. 6, авторы настоящего изобретения показали, что связывание mAb1 и mAb2 с FcγRIIIa сохранялось при введении в их соответствующую Fc-область замен, выбранных из группы:

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно.

Напротив, связывание FcγRIIIa уменьшалось при осуществлении в mAb1 и mAb2 замен тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно.

Таким образом, авторы настоящего изобретения идентифицировали по меньшей мере одно антитело, характеризующееся не измененным связыванием с его мишенью и улучшенным связыванием с рецептором FcRn человека, с сохранением при этом связывания FcγRIIIa, что делает его соответствующим для разработки терапевтических средств для предупреждения и лечения заболевания, вызываемого CHIKV, с учетом его увеличенного периода полужизни с сохранением при этом его эффекторных функций.

В типичном варианте осуществления вариантное антитело содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10 соответственно, и Fc-область, содержащую по меньшей мере лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

Иными словами, антитело, предусмотренное в данном документе, может быть описано как выделенное моноклональное антитело, которое связывается с CHIKV и содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), где

i. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10, или

ii. указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16, или

iii. указанные CDRH и CDRLH имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей, указанных в i или ii, одной или двумя аминокислотными заменами,

и где указанное антитело дополнительно содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из

iv. аланина в положении 434, или

v. аланина в положениях 307, 380 и 434, или

vi. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428, или

vii. лейцина в положении 428 и серина в положении 434, или

viii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом;

и где антитело характеризуется одним или несколькими из следующих свойств:

i. связывает мишень pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (K_D), составляющей менее приблизительно 10 нМ,

ii. связывает FcRn человека с K_D, составляющей менее приблизительно 200 нМ,

iii. связывает FcγRIII человека с K_D, составляющей менее приблизительно 600 нМ.

В одном варианте осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением связывает мишень pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (K_D), составляющей менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4 нМ, 3, 2, 1 нМ, менее приблизительно 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 нМ или менее приблизительно 0,25, 0,20, 0,15, 0,1 нМ.

В другом варианте осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением связывает FcRn человека с K_D, составляющей менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 50 нМ, 45, 40, 35, 30 нМ или менее приблизительно 25, 20, 15 или 10 нМ.

В другом варианте осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением связывает FcγRIII человека с K_D, составляющей менее приблизительно 600 нМ, менее приблизительно 500, 400, 300 нМ, менее приблизительно 200, 150, 100 или 50 нМ.

Связывание с мишенью pE2-E1 CHIKV, FcRn человека и FcγRIII человека можно, например, измерить с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса, например, при 37°C. Данный анализ можно выполнять, например, как описано в примерах 1-4.

"Fc-область" в соответствии с настоящим изобретением может принадлежать тяжелой цепи одного из четырех подклассов IgG человека (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), которые определяют функциональную активность антител. В одном варианте осуществления Fc-область принадлежит тяжелой цепи подтипа IgGl. В другом варианте осуществления Fc-область принадлежит тяжелой цепи подтипа IgG2. В другом варианте осуществления Fc-область принадлежит тяжелой цепи подтипа IgG3. В другом варианте осуществления Fc-область принадлежит тяжелой цепи подтипа IgG4. В другом варианте осуществления Fc-область содержит последовательность FC-области IgG1 (SEQ ID NO: 17), за исключением мутаций, описанных в данном документе (фиг. 1 и 2), или состоит из нее.

В одном варианте осуществления антитело имеет Fc-область, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 17, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело имеет Fc-область, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 17, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело имеет Fc-область, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 17, или состоит из нее. В дополнительном варианте осуществления антитело имеет Fc-область, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 17, или состоит из нее.

В одном варианте осуществления антитело имеет Fc-область, содержащую одну или несколько замен, описанных выше и в примерах. В другом варианте осуществления антитело имеет Fc-область, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 и 63, или состоит из нее.

В качестве альтернативы или дополнительно, в Fc-область можно вводить цистеиновый (цистеиновые) остаток (остатки), тем самым обеспечивая возможность образования межцепочечной дисульфидной связи в данной области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может характеризоваться усиленной способностью к интернализации, и/или увеличенным опосредованным комплементом цитолизом, и/или увеличенной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (Caron, P.C. et al., 1992, J Exp Med. 176(4): 1191-1195 и Shopes B., 1992, J Immunol. 148(9): 2918-2922).

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 1, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 1, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 1, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 1, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, ко-

торая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 2, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 2, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 2, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 2, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 19, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 19, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 19, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 19, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 20, или состоит из нее. В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 20, или состоит из нее. В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 20, или состоит из нее. В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 20, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 23, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 23, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 23, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 23, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 25, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 25, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 25, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 25, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 27, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 27, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 27, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 27, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 29, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 29, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 29, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 31, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 31, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% иден-

тичностью с SEQ ID NO: 31, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 31, или состоит из нее.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи или тяжелой цепи и легкой цепи, кодируемых нуклеотидной последовательностью, с последовательностями, описанными в табл. 2 ниже.

Таблица 2

	Аминокислотные последовательности		Нуклеотидные последовательности	
	HC	LC	HC	LC
mAb3=mAb1A	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:22
mAb4 = mAb1AAA	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:22
mAb5 = mAb1QL	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:22
mAb6 = mAb1YTE	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:22
mAb7 = mAb1LS	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:22

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 3, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 3, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 3, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 3, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 4, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 4, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 4, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей легкой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 4, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 37, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 37, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 37, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 37, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 38, или состоит из нее. В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 38, или состоит из нее. В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 38, или состоит из нее. В другом варианте осуществления легкая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 38, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 41, или состоит из нее. В другом вариан-

те осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 41, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 41, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 41, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 43, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 43, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 43, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 43, или состоит из нее.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи или тяжелой цепи и легкой цепи, кодируемых нуклеотидной последовательностью, с последовательностями, описанными в табл. 3 ниже.

Таблица 3

	Аминокислотные последовательности		Нуклеотидные последовательности	
	HC	LC	HC	LC
mAb8 = mAb2YTE	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:40
mAb9 = mAb2LS	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:40

Как уже упоминалось, для терапевтических целей крайне желательно создать mAb, которые будут оптимальными в отношении стабильности, фармакокинетических характеристик и фармакодинамических характеристик, а также их функций, с сохранением при этом их аффинности связывания с их конкретной мишенью.

Во втором аспекте авторы настоящего изобретения идентифицировали "горячие точки", которые можно использовать для увеличения однородности и ослабления требований в отношении химических свойств, производства и контроля (CMC). В таком анализе внимание сосредоточено на доступные для растворителя нежелательные мотивы, такие как мотивы окисления, дезамидирования, изомеризации, кислотного расщепления, гликозилирования, а также на дополнительные свободные цистеиновые остатки, идентифицированные либо in silico, либо экспериментальным путем, которые потенциально приводят к образованию продуктов деградации или к гетерогенности препаратов антител. В качестве примеров, дезамидирование аспарагинового и глутаминового остатков может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и доступность на поверхности. Аспарагиновые остатки особенно подвержены дезамидированию в основном, если находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Если такой участок дезамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в антителе или полипептиде, описанных в данном документе, тогда может быть желательно удалить данный участок, обычно посредством осуществления консервативной замены с удалением одного из задействованных остатков.

Как показано в примере 1 и на фиг. 3, авторы настоящего изобретения идентифицировали по меньшей мере три аминокислоты в CDRH3 mAb2 (SEQ ID NO: 13), которые могут иметь пагубные последствия как таковые или в связи с тем, что они создают неблагоприятный мотив с учетом предыдущих критериев, при применении в терапевтических целях. Как показано на фиг. 3, авторы настоящего изобретения создали по меньшей мере три вариантных антитела mAb2 с единичными заменами соответственно в положениях 8, 12 и 13 SEQ ID NO: 13, чтобы устранить нежелательные аминокислоты или мотивы, что поддерживает аффинность связывания с их антигеном pE2-E1 CHIKV. Следовательно, авторы настоящего изобретения создали варианты mAb2, характеризующиеся, в соответствии с критериями CMC, более высокой стабильностью, более высокой однородностью при производстве в биореакторах, меньшим количеством родственных примесей, при сохранении их аффинности в отношении мишени.

Следовательно, во втором аспекте настоящее изобретение относится к вариантным антителам mAb2 или их антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CHIKV и которые содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат три опреде-

ляющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и/или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и/или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В одном варианте осуществления вариантное антитело содержит CDRH с аминокислотными последовательностями, которые отличаются одной или двумя аминокислотными заменами от последовательностей под SEQ ID NO: 11, 12 и 33, и содержит CDRL с аминокислотными последовательностями, которые отличаются одной или двумя аминокислотными заменами от последовательностей под SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно. Под "аминокислотной последовательностью, которая отличается одной или двумя аминокислотными заменами" в отношении SEQ ID NO: 33 подразумеваются дополнительные аминокислотные замены по сравнению с заменами, предусмотренными в положениях 8, 12 и 13 SEQ ID NO: 33, предусмотренных в настоящем изобретении.

Аминокислотная замена может представлять собой консервативную или неконсервативную аминокислотную замену. Примеры консервативных замен приведены в табл. 1 выше.

В другом варианте осуществления вариантное антитело содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G. В другом варианте осуществления указанное вариантное антитело содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G. В других вариантах осуществления указанное вариантное антитело содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G; CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 представляет собой G; CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G; CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 представляет собой G; CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 представляет собой G; CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 представляет собой N, и аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G. Иными словами, SEQ ID NO: 33 не может быть идентичной SEQ ID NO: 13.

Под выражением "аминокислота в положении X не представляет собой M" подразумевается, что указанная аминокислота в положении X может представлять собой любую аминокислоту, кроме M. Аналогично, под выражением "аминокислота в положении X не представляет собой N" подразумевается, что указанная аминокислота в положении X может представлять собой любую аминокислоту, кроме N. Аналогично, под выражением "аминокислота в положении X не представляет собой G" подразумевается, что указанная аминокислота в положении X может представлять собой любую аминокислоту, кроме G. В качестве неограничивающего примера, вариантное антитело, где указанный вариант содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, может содержать в указанном положении 8 любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, V, L, I, F, W, Y, S, T, N, Q, C, D, E, K, R и H. В качестве другого неограничивающего примера, вариантное антитело, где указанный вариант содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, может содержать в указанном положении 12 любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, Q, C, D, E, K, R и H. В качестве другого неограничивающего примера, вариантное антитело, где указанный вариант содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G, может содержать в указанном положении 13 любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, N, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, Q, C, D, E, K, R и H.

В другом варианте осуществления вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 33;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и/или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и/или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В другом варианте осуществления вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

В другом варианте осуществления вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно, и дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G.

Иными словами, как показано в примере 1 и на фиг. 3, авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и которые дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G,

и где антитело характеризуется одним или несколькими из следующих свойств:

i. связывает мишень pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (K_D), составляющей менее приблизительно 10 нМ,

ii. связывает FcRn человека с K_D, составляющей менее приблизительно 200 нМ,

iii. связывает FcγRIII человека с K_D, составляющей менее приблизительно 600 нМ.

В одном варианте осуществления антитело связывает мишень pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (K_D), составляющей менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4, 3, 2, 1 нМ, менее приблизительно 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 нМ или менее приблизительно 0,25, 0,20, 0,15, 0,1 нМ.

В другом варианте осуществления антитело связывает FcRn человека с K_D, составляющей менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 50, 45, 40, 35, 30 нМ или менее приблизительно 25, 20, 15 или 10 нМ.

В другом варианте осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением связывает FcγRIII человека с K_D, составляющей менее приблизительно 600 нМ, менее приблизительно 500, 400, 300 нМ, менее приблизительно 200, 150, 100 или 50 нМ.

Связывание с мишенью pE2-E1 CHIKV, FcRn человека и FcγRIII человека можно, например, измерить с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса, например, при 37°C. Данный анализ можно выполнять, например, как описано в примерах 1-4.

В другом варианте осуществления вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 выбрана из группы, состоящей из I, L, V, Q и N.

В другом варианте осуществления вариантное антитело (mAb10) или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 34;
CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;
CDRL2, состоящую из GTS;
CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 выбрана из группы, состоящей из Q, E, S, T и D.

В другом варианте осуществления вариантное антитело (mAb11) или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;
CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;
CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 35;
CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;
CDRL2, состоящую из GTS;
CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33, где аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 выбрана из группы, состоящей из A, S и T.

В другом варианте осуществления вариантное антитело (mAb12) или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;
CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;
CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 36;
CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;
CDRL2, состоящую из GTS;
CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 56, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 56, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 56, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 56, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 57, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 57, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 57, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 57, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 58, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 58, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 58, или состоит из нее. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область своей тяжелой цепи, которая содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 58, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 45, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 45, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антите-

ла содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 45, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 47, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 47, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 47, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 47, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 49, или состоит из нее, или содержит последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 50, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 49, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 49, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 49, или состоит из нее.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи или тяжелой цепи и легкой цепи, кодируемых нуклеотидной последовательностью, с последовательностями, описанными в табл. 4 ниже.

Таблица 4

	Аминокислотные последовательности		Нуклеотидные последовательности	
	HC	LC	HC	LC
mAb10 = mAb2M104I	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:40
mAb11 = mAb2N108Q	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:40
mAb12 = mAb2G109A	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:40

В третьем аспекте авторы настоящего изобретения объединили вышеуказанные преимущественные аспекты. Авторы настоящего изобретения создали варианты mAb2, которые, с одной стороны, были замещены в CDRH3 для устранения аминокислот или мотивов, неблагоприятных с учетом требований в отношении химических свойств, производства и контроля (CMC), и, с другой стороны, характеризовались улучшенным связыванием с рецептором FcRn в кислой среде, с сохранением при этом связывания с FcγRIIIa, ассоциированного с эффекторными функциями, поскольку они содержали по меньшей мере одну аминокислотную замену в своем Fc-домене.

Как описано в примере 2 и на фиг. 4C и 4D, авторы настоящего изобретения показали, что вариант mAb2, в CDRH3 которого были введены замены, проявлял увеличенное связывание с рецепторами FcRn человека и мыши при pH 6 при введении в его Fc-область замен, выбранных из нижеприведенной группы:

i. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

ii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256.

Кроме того, авторы настоящего изобретения подтвердили, как описано в примере 3 и на фиг. 5, что связывание с их мишенью pE2-E1 CHIKV не изменялось у антител, содержащих замены в их CDRH3 и их Fc-области, описанные выше.

Как показано в примере 4 и на фиг. 6B и 6D, авторы настоящего изобретения также подтвердили, что у таких антител сохранялось связывание с FcγRIIIa по меньшей мере при введении в их Fc-область лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно. Напротив, связывание FcγRIIIa уменьшалось при осуществлении в таких антителах замен тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно.

Таким образом, авторы настоящего изобретения подтвердили на антителах в соответствии с настоящим изобретением, в которых были осуществлены замены в CDRH3 для устранения аминокислот или мотивов, неблагоприятных с учетом требований в отношении химических свойств, производства и контроля (CMC), положительные эффекты замен, введенных в их соответствующие Fc-области.

Следовательно, в данном третьем аспекте настоящее изобретение относится к вариантным антите-

лам mAb2 или их антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CHIKV и которые содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 33 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, GTS и 16 соответственно или имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от данных последовательностей одной или двумя аминокислотными заменами, и где

i. аминокислота в положении 8 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой M, и/или

ii. аминокислота в положении 12 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой N, и/или

iii. аминокислота в положении 13 в SEQ ID NO: 33 не представляет собой G,

и где указанное антитело содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере мутации, выбранные из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В третьем аспекте подразумевается, что любое антитело согласно второму аспекту, т.е. содержащее CDRH с SEQ ID NO: 33, может содержать любую мутацию в Fc-области, описанную в первом аспекте, при этом указанное антитело содержит Fc-область с по меньшей мере одним остатком, выбранным из группы, состоящей из

i. аланина в положении 434, или

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно, или

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, или

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления вариантное антитело (mAb13) или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 35;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16;

и Fc-область, содержащую по меньшей мере тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления вариантное антитело (mAb14) или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 11;

CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12;

CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 35;

CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;

CDRL2, состоящую из GTS;

CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16,

и Fc-область, содержащую по меньшей мере лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 51, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 51, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 51, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 51, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 53, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по мень-

шей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 53, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 53, или состоит из нее. В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит последовательность, характеризующуюся 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 53, или состоит из нее.

В одном варианте осуществления антитело в соответствии с данным конкретным аспектом представляет собой комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи или тяжелой цепи и легкой цепи, кодируемых нуклеотидной последовательностью, с последовательностями, описанными в табл. 5 ниже.

Таблица 5

	Аминокислотные последовательности		Нуклеотидные последовательности	
	HC	LC	HC	LC
mAb13 = mAb2N108QYTE	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:40
mAb14 = mAb2N108QLS	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:40

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева.

Дополнительный объект, предусмотренный в настоящем изобретении, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность или состоящей из нее, которая кодирует антитело, определенное в данном документе, или полипептид, тяжелую цепь, легкую цепь или фрагмент, содержащие антитело, описанное в данном документе, или его фрагмент, или состоящие из них.

Как правило, указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которую можно включать в любой подходящий вектор, такой как плазмида, космида, эписома, искусственная хромосома, фаг или вирусный вектор.

Термины "вектор", "клонирующий вектор" и "вектор экспрессии" означают носитель, с помощью которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) можно вводить в клетку-хозяина для того, чтобы трансформировать хозяина и обеспечить экспрессию (например, транскрипцию и трансляцию) введенной последовательности.

Таким образом, дополнительный объект, предусмотренный в настоящем изобретении, относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

Такие векторы могут содержать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и т.п., для обеспечения экспрессии указанного полипептида после введения субъекту или для управления ею. Примеры промоторов и энхансеров, применяемых в векторе для экспрессии в клетке животного, включают энхансер и промотор цитомегаловируса человека (Nelson, J., 1996 J. Virology 70: 3207-3986), ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami, T. and Itoh, S. et al., 1987, J Biochem. 101(5): 1307-1310), промотор и энхансер LTR вируса лейкоза мышей Молони (Kuwana Y. et al., 1987, Biochem Biophys Res Commun. 149: 960-968), промотор (Mason, J.O. et al., 1985, Cell 41: 479-487) и энхансер (Gillies, S.D. et al., 1983, Cell 33: 717-728) H-цепи иммуноглобулина и т.п.

Можно применять любой вектор для экспрессии в клетке животного, при условии, что ген, кодирующий С-область антитела человека, может быть вставлен и экспрессирован. Примеры подходящих векторов включают pAGE107 (Miyaji, H. et al., 1990, Cytotechnology 3(2): 133-140), pAGE103 (Mizukami, T. and Itoh, S. et al., 1987, J Biochem. 101(5): 1307-1310), pHSG274 (Brady, G. et al., 1984, Gene 27(2): 223-232), pKCR (O'Hare, K. et al., 1981, Proc Natl Acad Sci USA. 78(3): 1527-1531), pSG1 бета d2-4 (Miyaji, H. et al., 1990, Cytotechnology 4: 173-180) и т.п.

Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие точку начала репликации pCEP5, или интегративные плазмиды, такие как, например, pUC, pcDNA, pBR и т.п.

Другие примеры вирусного вектора включают векторы на основе аденовируса, ретровируса, вируса герпеса и AAV. Такие рекомбинантные вирусы можно получить посредством методик, известных из уровня техники, как, например, посредством трансфекции упаковывающих клеток или посредством временной трансфекции хелперными плазмидами или вирусами. Типичные примеры клеток, упаковывающих вирус, включают клетки PA317, клетки PsiCRIP, клетки GPenv+, клетки 293 и т.д. Подробные протоколы получения таких рекомбинантных вирусов, дефектных по репликации, можно найти, например, в WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 и WO 94/19478.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, характеризующемуся по меньшей мере 80% идентичностью с одной из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, характеризующемуся по меньшей мере 85% идентичностью с одной из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54. В другом варианте осуществле-

ния настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, характеризующемуся по меньшей мере 90% идентичностью с одной из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, характеризующемуся по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с одной из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему одну из тяжелых цепей или одну из легких цепей или обе тяжелые цепи и легкие цепи антител, описанных в данном документе, т.е. mAb3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе.

Дополнительный объект, предусмотренный в настоящем изобретении, относится к клетке, которая была трансфицирована, инфицирована или трансформирована нуклеиновой кислотой и/или вектором, описанными в данном документе.

Соответственно, настоящее изобретение относится к линии клеток, продуцирующей одно из антител, описанных в данном документе.

Термин "трансформация" означает введение "чужеродного" (т.е. постороннего) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина таким образом, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенные ген или последовательность с получением необходимого вещества, как правило, белка или фермента, кодируемого введенными геном или последовательностью. Клетка-хозяин, которая получила и экспрессирует введенную ДНК или РНК, становится "трансформированной".

Предусмотренные в данном документе нуклеиновые кислоты можно применять для получения рекомбинантного антитела к CHIKV в подходящей системе экспрессии. Термин "система экспрессии" означает клетку-хозяина и совместимый вектор в условиях, подходящих, например, для экспрессии белка, кодируемого чужеродной ДНК, которая находится в векторе и вводится в клетку-хозяина.

Общепринятые системы экспрессии включают клетки-хозяева E. coli и плазмидные векторы, клетки-хозяева насекомых и векторы на основе бакуловируса, а также клетки-хозяева млекопитающих и векторы для экспрессии у них. Другие примеры клеток-хозяев включают без ограничений прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как клетки дрожжей, клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки и т.д.). Конкретные примеры включают E. coli, дрожжи Kluyveromyces или Saccharomyces, линии клеток млекопитающих (например, клетки Vero, клетки CHO, клетки 3T3, клетки COS, клетки HEK293 и т.д.), а также первичные или установившиеся культуры клеток млекопитающих (например, полученные из лимфобластов, фибробластов, эмбриональных клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и т.д.). Примеры также включают клетку SP2/0-Ag14 мыши (ATCC CRL1581), клетку P3X63-Ag8.653 мыши (ATCC CRL1580), клетку CHO, в которой ген дигидрофолатредуктазы (называемый далее "ген DHFR") является дефектным (Urlaub, G. et al.; 1980, Proc Natl Acad Sci USA. 77(7): 4216-4220), клетку YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 крысы (ATCC CRL1662, называемую далее "клетка YB2/0") и т.п. Клетка YB2/0 представляет интерес, поскольку активность ADCC химерных или гуманизированных антител усиливается при экспрессии в данной клетке.

В частности, для экспрессии гуманизированного антитела вектор экспрессии может принадлежать к типу, у которого ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, расположены на отдельных векторах, либо к типу, у которого оба гена расположены на одном векторе (тандемный тип). В связи с простотой конструирования вектора экспрессии гуманизированного антитела, простотой введения в клетки животных и балансом между уровнями экспрессии H- и L-цепей антитела в клетках животных векторы экспрессии гуманизированного антитела тандемного типа являются широко применяемыми (Shitara, K. et al., 1994, J Immunol Methods. Jan.3 167(1-2): 271-8). Примеры векторов экспрессии гуманизированного антитела тандемного типа включают pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 и т.п.

Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантной клетки-хозяина, экспрессирующей антитело в соответствии с настоящим изобретением, при этом указанный способ включает стадии, предусматривающие

(i) введение in vitro или ex vivo рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектора, описанных выше, в компетентную клетку-хозяина,

(ii) культивирование in vitro или ex vivo полученной рекомбинантной клетки-хозяина, и

(iii) необязательно отбор клеток, которые экспрессируют и/или секретируют указанное антитело.

Такие рекомбинантные клетки-хозяева можно применять для получения антител к CHIKV, описанных в данном документе.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу получения моноклонального антитела в соответствии с настоящим изобретением, где указанный способ включает стадии

(i) культивирования линии клеток, описанной выше,

(ii) очистки полученного моноклонального антитела, и необязательно

(iii) составления указанного моноклонального антитела в фармацевтическую композицию.

Способы получения антител к CHIKV.

Антитела к CHIKV, предусмотренные в настоящем изобретении, можно получать с помощью любой методики, известной из уровня техники, такой как без ограничения любая химическая, биологическая, генетическая или ферментативная методика, либо отдельно, либо в комбинации.

Зная аминокислотную последовательность необходимой последовательности, специалист в данной области техники может легко получить указанные антитела или цепи иммуноглобулина с помощью стандартных методик получения полипептидов. Например, их можно синтезировать с применением хорошо известного твердофазного способа, в частности, с применением коммерчески доступного устройства для пептидного синтеза (такого как производимое Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния) и следуя инструкциям производителя. В качестве альтернативы, антитела и цепи иммуноглобулина можно синтезировать с помощью методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных из уровня техники. Например, эти фрагменты можно получать в виде продуктов экспрессии ДНК после внедрения последовательностей ДНК, кодирующих необходимый (поли) пептид, в векторы экспрессии и введения таких векторов в подходящих эукариотических или прокариотических хозяев, которые будут экспрессировать необходимый полипептид, из которых их позже можно выделить с применением хорошо известных методик.

В частности, настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения антитела, при этом указанный способ включает стадии

(i) культивирования трансформированной клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением,

(ii) обеспечения экспрессии указанного антитела или полипептида, и

(iii) извлечения экспрессированного антитела или полипептида.

Иными словами, настоящее изобретение относится к способу получения антитела, при этом указанный способ предусматривает стадии:

(i) обеспечения клетки, экспрессирующей антитело к CHIKV,

(ii) культивирования указанной клетки,

(iii) очистки указанного антитела, и

(iv) необязательно составления указанного антитела в фармацевтическую композицию.

Способы получения гуманизированных или химерных антител включают традиционные методики рекомбинантной ДНК и трансфекции генов, хорошо известные из уровня техники (см. Morrison, S.L. and Oi, V.T., 1984, Annu Rev Immunol 2: 239-256 и патентные документы US 5202238 и US 5204244).

В конкретном варианте осуществления химерное антитело по настоящему изобретению можно получать путем получения нуклеиновых последовательностей, кодирующих мышиные VL- и VH-домены, как описано ранее, конструирования вектора экспрессии химерного антитела посредством их вставки в вектор для экспрессии в клетке животного, который несет гены, кодирующие CH антитела человека и CL антитела человека, и обеспечения экспрессии кодирующей последовательности путем введения вектора экспрессии в клетку животного.

Антитела, предусмотренные в данном документе, подходящим образом отделяют от культуральной среды с помощью стандартных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, аффинная хроматография на белке A, хроматография на керамическом гидроксиапатите, хроматография на комбинированных носителях, эксклюзионная хроматография и т.д.

Fab можно получать путем обработки антитела, которое специфически реагирует с CHIKV, протеазой, такой как папаин. Также Fab можно получать путем вставки последовательностей ДНК, кодирующих обе цепи Fab из антитела, в вектор для экспрессии в прокариотической клетке или для экспрессии в эукариотической клетке и введения вектора в прокариотические или эукариотические клетки (в соответствующих случаях) для обеспечения экспрессии Fab.

F(ab')2 можно получать путем обработки антитела, которое специфически реагирует с CHIKV, протеазой, такой как пепсин. Также F(ab')2 можно получать путем связывания Fab', описанного ниже, с помощью тиоэфирной связи или дисульфидной связи.

Fab' можно получать путем обработки F(ab')2, который специфически реагирует с CHIKV, восстанавливающим средством, таким как дитиотреитол. Также Fab' можно получать путем вставки последовательностей ДНК, кодирующих цепи Fab' из антитела, в вектор для экспрессии в прокариотической клетке или в вектор для экспрессии в эукариотической клетке и введения вектора в прокариотические или эукариотические клетки (в соответствующих случаях) для обеспечения его экспрессии.

scFv можно получать путем использования последовательностей CDR или VH- и VL-доменов, описанных ранее, конструирования ДНК, кодирующей scFv-фрагмент, вставки ДНК в вектор для экспрессии в прокариотической или эукариотической клетках и затем введения вектора экспрессии в прокариотические или эукариотические клетки (в соотвествующих случаях) для обеспечения экспрессии scFv. Для получения гуманизированного scFv-фрагмента можно применять хорошо известную технологию, называемую привитие CDR, которая предусматривает отбор определяющих комплементарность областей (CDR) в соответствии с настоящим изобретением и привитие их на каркас scFv-фрагмента человека с известной трехмерной структурой (см., например, WO 98/45322; WO 87/02671; US 5859205; US 5585089; US 4816567; EP 0173494).

Одноцепочечное антитело или VHH, направленное против CHIKV, можно получать, например, способом, включающим стадии

(a) иммунизации млекопитающего, принадлежащего к верблюдовым, CHIKV или его фрагментом, чтобы вызвать выработку антител (и, в частности, антител с тяжелой цепью) к CHIKV;

(b) получения биологического образца из иммунизированного таким образом представителя верблюдовых, при этом указанный образец содержит последовательности антител с тяжелой цепью и/или последовательности VHH, которые направлены против CHIKV; и

(c) извлечения (например, выделения) последовательностей антител с тяжелой цепью и/или последовательностей VHH, которые направлены против CHIKV, из указанного биологического образца. В качестве неограничивающего примера, подходящее одноцепочечное антитело или VHH также можно получить путем скрининга библиотеки, содержащей последовательности антител с тяжелой цепью и/или последовательности VHH, в отношении последовательностей антител с тяжелой цепью и/или последовательностей VHH, которые конкурируют за связывание с pE2-E1 CHIKV.

Модификация антител к CHIKV по настоящему изобретению.

Дополнительный объект настоящего изобретения охватывает функционально консервативные варианты антител, описанных в данном документе.

Например, определенные аминокислоты можно заменять другими аминокислотами в структуре белка без существенной потери активности. Поскольку способность к взаимодействию и природа белка определяют его биологическую функциональную активность, можно производить определенные аминокислотные замены в белковой последовательности и, конечно же, в его кодирующей последовательности ДНК, при этом все же получая белок с подобными свойствами. Таким образом, подразумевается, что различные изменения можно производить в последовательностях антител или соответствующих последовательностях ДНК, которые кодируют указанные антитела, без существенной потери их связывающей активности.

Из уровня техники известно, что определенные аминокислоты можно заменять другими аминокислотами, характеризующимися аналогичным индексом или баллом гидропатичности, и при этом все еще получать белок с аналогичной биологической активностью, т.е. все еще получать белок с эквивалентной биологической функцией. Также возможно применять хорошо известные технологии, такие как подходы аланинового сканирования, для идентификации в антителе всех аминокислот, которые можно заменить без значительной потери связывания с антигеном. Такие остатки можно характеризовать как нейтральные, поскольку они не вовлечены в связывание антигена или в поддержание структуры антитела. В одно или несколько этих нейтральных положений можно вводить замену на аланин или другую аминокислоту без изменения основных характеристик антитела.

Следовательно, как указывалось выше, аминокислотные замены, как правило, основаны на относительном сходстве заместителей в боковой цепи аминокислоты, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Иллюстративные замены, которые учитывают несколько из вышеприведенных особенностей, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин и валин, лейцин и изолейцин.

Другой тип модификации аминокислот в антителе может быть применимым для изменения исходного паттерна гликозилирования антитела, т.е. путем удаления одного или нескольких углеводных фрагментов, находящихся в антителе, и/или путем добавления одного или нескольких участков гликозилирования, которые не присутствовали в антителе. Присутствие одной из трипептидных последовательностей: аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, создает потенциальный участок гликозилирования. Добавление участков гликозилирования в антитело или их делецию из него удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-сцепленных участков гликозилирования).

Другой тип ковалентной модификации предусматривает связывание гликозидов с антителом химическим или ферментативным путем. Эти процедуры имеют преимущество в том, что они не требуют производства антител в клетке-хозяине, которая обладает способностью к гликозилированию с целью N- или O-сцепленного гликозилирования. В зависимости от используемой схемы связывания сахар (сахара) можно прикреплять к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группами, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин или тирозин, (f) амидной группе глутамина. Например, такие способы описаны в WO 87/05330.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих в антителе, может быть достигнуто химическим или ферментативным путем. При химическом дегликозилировании антитело необходимо подвергать воздействию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Данная обработка приводит к отщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением сшивающих Сахаров (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя при этом антитело интактным. Химическое дегликозилирование описано в Sojahr, H. et al. (1987, Arch Biochem Biophys. 259(1): 52-57) и Edge, A.S. et al. (1981, Anal Biochem. 118(1): 131-137). Ферментативное отщепление углеводных фраг-

ментов антител может достигаться с помощью применения различных эндо- и экзогликозидаз, описанных в Thotakura, NR. et al. (1987, Methods Enzymol 138: 350-359).

Другой тип ковалентной модификации антитела предусматривает связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, с полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, с помощью способов, изложенных в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

Фармацевтические композиции.

Антитела к CHIKV по настоящему изобретению можно объединять с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами и необязательно матрицами для замедленного высвобождения, такими как биоразлагаемые полимеры, с образованием терапевтических композиций.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к антителу в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного препарата.

"Фармацевтическими" или "фармацевтически приемлемыми" называют молекулярные объекты и композиции, не вызывающие побочную, аллергическую или другую нежелательную реакцию при введении млекопитающему, в частности человеку, в соответствующих случаях. Фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным средством называют нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество для составления любого типа.

Форма фармацевтических композиций, путь введения, дозировка и схема обычно зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести болезни, возраста, веса и пола пациента и т.д.

Фармацевтические композиции можно составлять для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и т.п.

В частности, фармацевтические композиции содержат среды-носители, которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, который подлежит инъецированию. Они могут представлять собой, в частности, изотонические стерильные солевые растворы (мононатрия или динатрия фосфата, хлорида натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смесей таких солей) или сухие, в частности высушенные сублимацией, композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора обеспечивают получение инъекционных растворов.

Дозы, применяемые для введения, можно адаптировать в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от применяемого способа введения, от соответствующей патологии или, в качестве альтернативы, от необходимой продолжительности лечения.

Для получения фармацевтических композиций эффективное количество антитела можно растворять или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CHIKV, как описано в данном документе, в профилактически или терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы сохранялась возможность ее легкого введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и ее необходимо предохранять от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ, стабилизаторов, криозащитных веществ или антиоксидантов.

Предотвращение действия микроорганизмов можно осуществлять с помощью противобактериальных и противогрибковых средств. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия.

Стерильные инъекционные растворы получают путем включения активных соединений в необходимом количестве в соответствующем растворителе вместе с некоторыми другими ингредиентами, перечисленными выше, в случае необходимости, с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов общепринятые способы получения включают методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые обеспечивают получение порошковой формы активного ингредиента с любым дополни-

тельным необходимым ингредиентом из его раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

После составления растворы будут вводить способом, соответствующим дозированному составу, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы без труда вводят в разнообразных лекарственных формах, как, например, типа инъекционных растворов, описанных выше, однако также можно использовать капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

Для парентерального введения в виде водного раствора, например, раствор следует надлежащим образом забуферить при необходимости, а жидкий разбавитель вначале сделать изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Данные конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим стерильные водные среды, которые можно использовать, будут известны специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавить к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса либо инъецировать в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Неизбежно будет иметь место некоторое изменение дозы в зависимости от состояния субъекта, подлежащего лечению. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять соответствующую дозу для отдельного субъекта.

Антитело можно составлять в терапевтическую смесь таким образом, чтобы она содержала приблизительно 0,01-100 миллиграммов на дозу или около того.

В соответствии с определенными вариантами осуществления одну или несколько доз антитела к CHIKV, описанного в данном документе, можно вводить субъекту в течение определенного промежутка времени.

Способы в соответствии с данным аспектом предусматривают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к CHIKV. Как используется в данном документе, "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к CHIKV вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные предварительно заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к CHIKV, затем одной или нескольких вторичных доз антитела к CHIKV, а затем необязательно одной или нескольких третичных доз антитела к CHIKV.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к CHIKV. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале лечебной схемы (также обозначается как "исходная доза"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальной, вторичных и третичных доз могут содержать одинаковое количество антитела к CHIKV, но, как правило, они могут отличаться друг от друга по частоте введения. Однако в определенных вариантах осуществления количества антитела к CHIKV, содержащиеся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, отличаются друг от друга (например, корректируются в сторону повышения или понижения при необходимости) в ходе курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале лечебной схемы в виде "ударных доз", затем последующие дозы вводят с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

Способы и пути применения в терапии.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения инфекции, вызываемой CHIKV, у пациента, нуждающегося в этом, или лечения пациента, страдающего от инфекции, вызываемой CHIKV, или ослабления по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с инфекцией, вызываемой CHIKV, при этом способ предусматривает введение одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько антител к CHIKV, предусмотренных в настоящем изобретении, или их фрагментов, описанных в данном документе, пациенту, нуждающемуся в этом, в результате чего происходит предупреждение инфекции, вызываемой CHIKV, или по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с инфекцией, ослабляется, облегчается или уменьшается по тяжести и/или продолжительности.

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает уменьшение патологии, связанной с инфекцией, вызываемой CHIKV.

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает облегчение симптомов, связанных с острой фазой, фазой после купирования острых симптомов или хронической фазой полиартрита/полиартралгии/артралгии, ассоциированной с CHIKV, лихорадки, сыпи, миалгии и/или усталости. В одном варианте осуществления способ обеспечивает уменьшение боли у субъекта, связанной с инфекцией, вызываемой CHIKV. В одном варианте осуществления антитело, применяемое для лечения/уменьшения интенсивности симптомов, связанных с инфекцией, вызываемой CHIKV, может перекрестно реагировать и обеспечивать лечение симптома, связанного с инфекциями, вызываемыми другими альфа-вирусами. В одном варианте осуществления антитело применяют для лечения/уменьшения

интенсивности острой фазы, фазы после купирования острых симптомов и хронической фазы полиартрита/полиартралгии, связанных с инфекцией, вызываемой CHIKV.

Примеры таких других альфа-вирусов включают без ограничения вирус о'Нъонг-нъонг (ONNV), вирус реки Росс (RRV), вирус леса Барма (BFV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус леса Семлики (SFV), вирус Синдбис (SINV), вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV). Симптомы, которые подвергают лечению или уменьшению интенсивности, могут включать без ограничения боль, лихорадку и т.п.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ лечения субъекта, инфицированного вирусом чикунгуньи, или снижения вероятности инфицирования субъекта, подверженного риску заражения вирусом чикунгуньи, предусматривающий доставку указанному субъекту антитела, связывающегося с CHIKV, или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат последовательности CDR из антител, указанных в таблицах 2-5 соответственно.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ лечения субъекта, инфицированного вирусом чикунгуньи, или снижения вероятности инфицирования субъекта, подверженного риску заражения вирусом чикунгуньи, предусматривающий доставку указанному субъекту антитела, связывающегося с CHIKV, указанного в табл. 2-5 соответственно. В другом варианте осуществления одно, два или несколько антител из числа перечисленных в табл. 2-5 могут быть объединены. В другом варианте осуществления антитело может кодировать вариантное антитело, содержащее тяжелые и легкие цепи с вариабельными последовательностями, характеризующимися 70, 80, 90 или 95% идентичностью с вариабельными последовательностями одного из антител, указанных в табл. 2-5. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантный ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент) антитела, Fab-фрагмент, F(ab')2-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой IgG и/или химерное антитело. Антитело или фрагмент антитела можно вводить до инфицирования или после инфицирования. Доставка может предусматривать введение антитела или фрагмента антитела или генетическую доставку с помощью последовательности РНК или ДНК или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела.

Как отмечено выше, способы по настоящему изобретению предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в этом, одного антитела, описанного в данном документе, выбранного из группы, состоящей из mAb3, mAb4, mAb5, mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb10, mAb11, mAb12, mAb13 и mAb14, указанных в табл. 2, 3, 4 и 5, для предупреждения или лечения инфекции/симптомов, вызываемых CHIKV.

Как отмечено выше, способы по настоящему изобретению предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в этом, одного антитела, описанного в данном документе, выбранного из группы, состоящей из mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb13 и mAb14, для предупреждения или лечения инфекции/симптомов, вызываемых CHIKV. В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в этом, одного антитела, предусмотренного в настоящем изобретении, выбранного из группы, состоящей из mAb7 и mAb14, для предупреждения или лечения инфекции/симптомов, вызываемых CHIKV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, описанному в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, описанному в данном документе, для применения в лечении инфекции, вызываемой CHIKV. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу для применения в лечении артралгии, ассоциированной с CHIKV. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу для применения в лечении острой фазы, фазы после купирования острых симптомов и хронической фазы полиартрита/полиартралгии, связанных с инфекцией, вызываемой CHIKV. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу для применения в лечении симптомов, связанных с острой фазой, фазой после купирования острых симптомов или хронической фазой полиартрита/полиартралгии/артралгии, ассоциированной с CHIKV, лихорадки, сыпи, миалгии и/или усталости. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу для применения в уменьшении боли у субъекта, связанной с инфекцией, вызываемой CHIKV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к моноклональному антителу для применения в предупреждении инфекции, вызываемой CHIKV. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, выбранному из группы, состоящей из mAb3, mAb4, mAb5, mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb10, mAb11, mAb12, mAb13 и mAb14, указанных в табл. 2, 3, 4 и 5, для применения в лечении инфекции и симптомов, указанных выше. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, выбранному из группы, состоящей из mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb13 и mAb14, указанных в табл. 2, 3 и 5, для применения в лечении инфекции и симптомов, указанных выше. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, выбранному из группы, состоящей из mAb7 и mAb14, указанных в табл. 2 и 5, для применения в лечении инфекции и симптомов, указанных выше.

В другом аспекте моноклональное антитело к CHIKV по настоящему изобретению или его антиген-

связывающий фрагмент можно применять для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой CHIKV, или связанных с ней симптомов в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

Используемое в данном документе выражение "в комбинации с" означает, что дополнительные терапевтические средства вводят до фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV, предусмотренное в настоящем изобретении, после нее или совместно с ней. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или совместное введение антитела к CHIKV и второго терапевтического средства.

Например, при введении "до" фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV, дополнительное терапевтическое средство можно вводить за приблизительно 72 часа, приблизительно 60 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 24 часа, приблизительно 12 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 4 часа, приблизительно 2 часа, приблизительно 1 час, приблизительно 30 минут, приблизительно 15 минут или приблизительно 10 минут до введения фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV. При введении "после" фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV, дополнительное терапевтическое средство можно вводить через приблизительно 10 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 24 часа, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 60 часов или приблизительно 72 часа после введения фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV. Введение "одновременно" или вместе с фармацевтической композицией, содержащей антитело к CHIKV, означает, что дополнительное терапевтическое средство вводят субъекту в отдельной лекарственной форме в течение менее 5 минут (до, после или в то же самое время) от введения фармацевтической композиции, содержащей антитело к CHIKV, или вводят субъекту в виде одного комбинированного дозированного состава, содержащего как дополнительное терапевтическое средство, так и антитело к CHIKV.

Виды комбинированной терапии могут включать антитело к CHIKV, описанное в данном документе, и любое дополнительное терапевтическое средство, которое может быть преимущественно объединено с антителом или с биологически активным фрагментом антитела.

Например, второе или третье терапевтическое средство можно применять с целью содействия уменьшению интенсивности симптомов, связанных с инфекцией, вызываемой CHIKV, которые включают без ограничения острую фазу, фазу после купирования острых симптомов или хроническую фазу полиартрита/полиартралгии/артралгии, ассоциированной с CHIKV, лихорадку, сыпь, миалгию и/или усталость. Например, второе или третье терапевтическое средство можно применять с целью содействия уменьшению боли, связанной с инфекцией, вызываемой CHIKV.

Пути применения в диагностике.

В другом аспекте моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в настоящем изобретении, применяют для обнаружения присутствия или отсутствия антигена CHIKV в образце. В одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, применяют в качестве компонента анализа, включающего стадию приведения в контакт образца с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, стадию обнаружения связывания моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном CHIKV, где обнаружение связывания свидетельствует о присутствии антигена CHIKV или отсутствие обнаружения связывания с антигеном CHIKV свидетельствует об отсутствии антигена CHIKV.

В частности, моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, применяют как компонент терапевтического средства, так и компонент диагностического анализа.

В варианте осуществления антитело предназначено для применения in vitro или ex vivo. Например, CHIKV можно обнаруживать in vitro или ex vivo в биологическом образце, полученном от субъекта, с применением антитела к CHIKV, описанного в данном документе.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу обнаружения in vitro или ex vivo наличия инфекции, вызываемой CHIKV, у субъекта, включающему стадии, предусматривающие

i. приведение биологического образца от субъекта в контакт с антителом к CHIKV, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом,

ii. измерение уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,

iii. обнаружение наличия инфекции, вызываемой CHIKV, путем сравнения измеренного уровня связавшегося антитела с контролем, при этом повышенный уровень связавшегося антитела по сравнению с контролем свидетельствует об инфекции, вызываемой CHIKV.

Настоящее изобретение также относится к способу определения in vitro или ex vivo восприимчивости пациента, инфицированного CHIKV, к терапевтическому средству, нацеливающемуся на CHIKV, в частности, к антителу к CHIKV или его антигенсвязывающему фрагменту, описанным в данном доку-

менте, при этом способ включает стадии, предусматривающие

i. приведение биологического образца от пациента, инфицированного CHIKV, в контакт с антителом к CHIKV или его антигенсвязывающим фрагментом, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом,

ii. измерение уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,

iii. сравнение измеренного уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, с уровнем антитела, связавшегося с контролем,

где повышенный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем свидетельствует о том, что пациент является восприимчивым к терапевтическому средству, нацеливающемуся на CHIKV.

В вышеуказанным способах указанный контроль может представлять собой нормальный неинфицированный биологический образец того же типа или эталонное значение, определенное как типичное значение уровня связывания антитела в нормальном биологическом образце того же типа.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу отслеживания in vitro или ex vivo эффективности терапии, направленной против инфекции, вызываемой CHIKV, включающему стадии, предусматривающие

i. приведение биологического образца от субъекта, подвергаемого терапии против инфекции, вызываемой CHIKV, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом,

ii. измерение уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,

iii. сравнение измеренного уровня связавшегося антитела с уровнем антитела, связавшегося с контролем,

где сниженный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем свидетельствует об эффективности указанной терапии против инфекции, вызываемой CHIKV.

В указанном способе повышенный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем свидетельствует об отсутствии эффективности указанной терапии против инфекции, вызываемой CHIKV.

Указанный контроль, в частности, представляет собой биологический образец того же типа, что и биологический образец, предоставленный для анализа, но который был получен от субъекта раньше в ходе терапии против инфекции, вызываемой CHIKV.

В варианте осуществления антитела к CHIKV или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе (например, E2-связывающие фрагменты), могут быть мечеными обнаруживаемой молекулой или веществом, таким как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любая другая метка, известная из уровня техники, которые обеспечивают (либо непосредственно, либо опосредованно) сигнал.

Используемый в данном документе термин "меченое" в отношении антитела в соответствии с настоящим изобретением подразумевается как охватывающий прямое мечение антитела путем связывания (т.е. физического соединения) обнаруживаемого вещества, такого как радиоактивное средство или флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), или фикоэритрин (PE), или индоцианин (Cy5)) с полипептидом, а также непрямое мечение полипептида вследствие способности реагировать с обнаруживаемым веществом.

"Образцы" или "биологический образец", которые можно использовать в диагностических анализах CHIKV в соответствии с настоящим изобретением, включают образец любой ткани или жидкости, который может быть получен от пациента при нормальном или патологическом состояниях.

Биологические образцы включают без ограничения кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы плотных тканей, такие как биоптат, или тканевые культуры, или клетки, полученные из них, и их потомство. Следовательно, биологические образцы охватывают клинические образцы, клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку крови, плазму крови, биологические жидкости и образцы тканей.

Наборы.

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы, содержащие по меньшей мере одно антитело к CHIKV или антигенсвязывающий фрагмент. Наборы, содержащие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, находят применение при обнаружении CHIKV или в терапевтических или диагностических анализах. Наборы могут содержать полипептид или антитело, связанные с твердой подложкой, например, планшетом для культивирования тканей или гранулами (например, сефарозными гранулами). Могут предусматриваться наборы, которые содержат антитела для обнаружения и количественного определения CHIKV in vitro, например, в ELISA или вестерн-блоттинге. Такое антитело, применимое для обнаружения, может быть снабжено меткой, такой как флуоресцентная или радиоизотопная метка.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору, содержащему по меньшей мере одно антитело, предусмотренное в данном документе, и необязательно упаковочный ма-

териал, и необязательно этикетку или упаковочный вкладыш, содержащиеся в указанном упаковочном материале, указывающие на то, что указанное антитело, предусмотренное в данном документе, является эффективным для предупреждения/лечения инфекции, вызываемой CHIKV, или симптомов, связанных с инфекцией, вызываемой CHIKV.

Краткое описание последовательностей

Под SEQ ID NO: 1 показана последовательность VH антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 2 показана последовательность VL антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 3 показана последовательность VH антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 4 показана последовательность VL антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 5-7 показаны последовательности CDR1H, CDR2H, CDR3H антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 8 показана последовательность CDR1L антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 9 показана последовательность рекомбинантного pE2-E1 рекомбинантной мишени "His-меченого E2 CHIKV LR2006".

Под SEQ ID NO: 10 показана последовательность CDR3L антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 11-13 показаны последовательности CDR1H, CDR2H, CDR3H антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 14 показана последовательность CDR1L антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 15 показана последовательность рекомбинантного pE2-E1 рекомбинантной мишени "His-меченого E2 CHIKV SL15649".

Под SEQ ID NO: 16 показана последовательность CDR3L антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 17 показана последовательность Fc-области IgG1 без замен, представленная в настоящем изобретении и показанная на фиг. 1.

Под SEQ ID NO: 18 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc-область IgG1.

Под SEQ ID NO: 19 показана последовательность HC антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 20 показана последовательность LC антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 21 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 22 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LC антитела "mAb1".

Под SEQ ID NO: 23 показана последовательность HC антитела "mAb3".

Под SEQ ID NO: 24 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb3".

Под SEQ ID NO: 25 показана последовательность HC антитела "mAb4".

Под SEQ ID NO: 26 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb4".

Под SEQ ID NO: 27 показана последовательность HC антитела "mAb5".

Под SEQ ID NO: 28 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb5".

Под SEQ ID NO: 29 показана последовательность HC антитела "mAb6".

Под SEQ ID NO: 30 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb6".

Под SEQ ID NO: 31 показана последовательность HC антитела "mAb7".

Под SEQ ID NO: 32 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb7".

Под SEQ ID NO: 33 показана консенсусная последовательность CDRH3 антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 34 показана последовательность CDRH3 антитела "mAb10".

Под SEQ ID NO: 35 показана последовательность CDRH3 антитела "mAb11".

Под SEQ ID NO: 36 показана последовательность CDRH3 антитела "mAb12".

Под SEQ ID NO: 37 показана последовательность HC антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 38 показана последовательность LC антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 39 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 40 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LC антитела "mAb2".

Под SEQ ID NO: 41 показана последовательность HC антитела "mAb8".

Под SEQ ID NO: 42 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb8".

Под SEQ ID NO: 43 показана последовательность HC антитела "mAb9".

Под SEQ ID NO: 44 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb9".

Под SEQ ID NO: 45 показана последовательность HC антитела "mAb10".

Под SEQ ID NO: 46 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела

"mAb10".

Под SEQ ID NO: 47 показана последовательность HC антитела "mAb11".

Под SEQ ID NO: 48 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb11".

Под SEQ ID NO: 49 показана последовательность HC антитела "mAb12".

Под SEQ ID NO: 50 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb12".

Под SEQ ID NO: 51 показана последовательность HC антитела "mAb13".

Под SEQ ID NO: 52 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb13".

Под SEQ ID NO: 53 показана последовательность HC антитела "mAb14".

Под SEQ ID NO: 54 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HC антитела "mAb14".

Под SEQ ID NO: 55 показана последовательность константной области IgG1, показанной на фиг. 1.

Под SEQ ID NO: 56 показана последовательность VH антитела "mAb10".

Под SEQ ID NO: 57 показана последовательность VH антитела "mAb11".

Под SEQ ID NO: 58 показана последовательность VH антитела "mAb12".

Под SEQ ID NO: 59 показана последовательность Fc-области IgG1 с аланином в положении 434 в соответствии с настоящим изобретением, как показано на фиг. 2.

Под SEQ ID NO: 60 показана последовательность Fc-области IgG1 с аланином в положениях 307, 380 и 434 соответственно в соответствии с настоящим изобретением, как показано на фиг. 2.

Под SEQ ID NO: 61 показана последовательность Fc-области IgG1 с глутамином в положении 250 и лейцином в положении 428 соответственно в соответствии с настоящим изобретением, как показано на фиг. 2.

Под SEQ ID NO: 62 показана последовательность Fc-области IgG1 с тирозином в положении 252, треонином в положении 254 и глутаминовой кислотой в положении 256 соответственно в соответствии с настоящим изобретением, как показано на фиг. 2.

Под SEQ ID NO: 63 показана последовательность Fc-области IgG1 с лейцином в положении 428 и серином в положении 434 соответственно в соответствии с настоящим изобретением, как показано на фиг. 2.

Примеры

Материалы и способы.

Анализ и конструирование моноклональных антител.

Аминокислотные последовательности антител к CHIKV анализировали с применением Antibody Inspector (разработанного для внутреннего пользования инструмента для анализа последовательности антител) в сочетании с инструментами для 3D-моделирования/структурного анализа (пакет программ Biovia Discovery Studio) для скрининга потенциальных проблем и участков, подверженных воздействию, для разработки. Анализ участков, подверженных воздействию, сосредоточен на доступных для растворителя нежелательных мотивах, таких как мотивы окисления, дезамидирования, изомеризации, кислотного расщепления, гликозилирования, и дополнительных свободных Cys. Все доступные для растворителя участки, подверженные воздействию, приоритизировали в зависимости от их местоположения (CDR, каркасные участки вариабельных доменов, константные домены). Предполагалось, что мутации минимизируют участки, подверженные воздействию, обнаруженные в последовательностях.

Создание оптимизированных антител.

Оптимизированные по кодонам фрагменты генов синтезировали и клонировали в вектор для экспрессии у млекопитающих. Трансфекцию осуществляли в соответствии с протоколом производителя с использованием системы экспрессии Expi293F (Thermo Fisher Scientific). Собранные образцы в кондиционированной среде очищали через колонку с белком A, и элюированные фракции подвергали замене буфера на Gibco PBS, pH 7,4.

Анализ связывания: связывание антигена, связывание FcRn человека и мыши, связывание FcγRIIIa.

Связывание рекомбинантного антигена E2 CHIKV измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с применением прибора Biacore T200. На сенсорный чип CM5 серии S иммобилизовали антитело к тетра His-меченому белку (Qiagen) при уровнях насыщения с помощью стандартной процедуры аминного связывания, предоставленной Biacore. Рекомбинантные антигены E2 CHIKV, т.е. рекомбинантные белковые конструкции на основе His-меченого E2 CHIKV LR2006 (SEQ ID NO: 9) и His-меченого E2 CHIKV SL15649 (SEQ ID NO: 15), получали исходя из Voss et al., 2010 (Voss JE et al 2010, Nature 468: 709-712), обеспечивали их временную экспрессию в клетках HEK293 и очищали из них (Pal et al, 2013, PLoS Pathog9, e1003312; Smith et al, 2015, Cell Host & Microbe 18: 86-95). По существу, эти конструкции конструировали в виде сигнальный пептид-E3_E2-(G4S)4-E1-His8, но в зрелой форме сигнальный пептид и E3 отщепляются. Рекомбинантные антигены His-меченый E2 CHIKV LR2006 и His-меченный E2 CHIKV SL15649 разбавляли в подвижном буфере HBS-EP+ и впрыскивали в течение 30 с для достижения уровня захвата от 10 до 30 RU. Тестируемые антитела серийно разводили в 3 раза от 30

до 1,1 нМ. Низкоаффинные связующие вещества серийно разбавляли от 900 нМ. Каждое антитело впрыскивали к захваченным антигенам и на контрольные поверхности в течение 3 мин в двух повторностях при скорости потока 65 мкл/мин, при этом обеспечивали диссоциацию в течение 5 или 15 мин Поверхности восстанавливали с помощью глицина, pH 1,5. Кинетические константы рассчитывали с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценки Biacore T200.

Для измерения связывания FcRn на сенсорный чип CM5 серии S непосредственно иммобилизовали рекомбинантный FcRn человека или FcRn мыши с помощью стандартного химического подхода связывания аминов с получением поверхностной плотности 1700RU и 800RU соответственно. Тестируемые антитела разбавляли до 200 и 50 нМ в буфере с 50 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 6,0 или pH 7,4. Разбавленные образцы впрыскивали в течение 3 мин с последующим обеспечением диссоциации в течение 5 мин в буфере при 10 мкл/мин в двух повторностях. Поверхности восстанавливали с помощью боратного буфера, pH 8,5.

Связывание FcγRIIIa измеряли с помощью прибора Biacore 3000. На чип CM5 иммобилизовали антитело к HPC4 при уровнях насыщения посредством аминного связывания. Два полиморфизма рекомбинантного FcγRIIIa человека сравнивали в анализе (Val158 и Phe158). Рекомбинантные FcγRIIIa-V158 и FcγRIII-F158 человека, меченые HPC4, разбавляли в буфере HBS-P+, содержащем 2 мМ CaCl2, и впрыскивали к Fc2 или Fc4 соответственно в течение 30 с при 10 мкл/мин для достижения уровня захвата 10-40 RU. Образцы разбавляли до 900, 300 и 100 нМ и впрыскивали в течение 2 мин с последующим обеспечением диссоциации в течение 3 мин в буфере при 30 мкл/мин в двух повторностях. Поверхности восстанавливали в течение 3 минут с помощью 10 мМ EDTA в буфере HBS-EP+ при 20 мкл/мин.

Результаты.

Пример 1. Связывание антигена mAb2 с заменами в CDRH3.

Результаты представлены на фиг. 3. Влияния мутаций в CDRH3 mAb2, введенных для устранения потенциальных мотивов дезамидирования и окисления, измеряли в отношении связывания с антигеном pE2-E1 CHIKV, полученным из штаммов LR2006 CHIKV. Связывание измеряли соответственно для

mAb2 и полученных из него вариантов mAb10, mAb11 и mAb12, содержащих соответственно изолейцин в положении 8 его CDRH3, глутамин в положении 12 его CDRH3 и аланин в положении 13 его CDRH3, а также для варианта, содержащего аланин в положении 8 его CDRH3, и вариантов, содержащих различные комбинации двух замен среди перечисленных выше.

Среди семи мутантов, созданных для устранения потенциальных мотивов дезаминирования и окисления, только у mAb11, содержащего глутамин в положении 12 его CDRH3 (mAb2 N108Q), сохранялась аффинность связывания с мишенью, эквивалентная исходному mAb. Следует отметить, что mAb10, содержащее изолейцин в положении 8 его CDRH3 (mAb2 M104I), и mAb12, содержащее аланин в положении 13 его CDRH3 (mAb2 G109A), демонстрировали промежуточные профили; у двойных мутантов утрачивалась их аффинность связывания с мишенью, а также у варианта, содержащего аланин в положении 8 его CDRH3 (mAb2 M104A).

Пример 2. Связывание FcRn.

Результаты представлены на фиг. 4. Связывание с FcRn человека (фиг. 4A и 4C) и мыши (фиг. 4B и 4D) измеряли при pH 6,0 для

mAb1 и mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 и mAb7, содержащих соответственно в своих Fc-областях аланин в положении 434, аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно и тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256;

mAb2 и mAb8, mAb9, mAb11, mAb13 и mAb14, содержащих соответственно в своих Fc-областях тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, глутамин в положении 12 его CDRH3, тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, а также глутамин в положении 12 его CDRH3, лейцин в положении 428 и серин в положении 434, а также глутамин в положении 12 его CDRH3.

Все мутанты демонстрировали увеличенную аффинность связывания FcRn, что, как ожидается, приведет к увеличению периода полужизни и, следовательно, положительно повлияет на их применимость в терапии против CHIKV. Мутанты, содержащие лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, и тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256 соответственно, демонстрировали наиболее сильное связывание по сравнению с другими мутантами.

Пример 3. Влияния замен в Fc-области на связывание mAb1 и mAb2 с мишенью.

Результаты представлены на фиг. 5. Влияние замен в Fc-области измеряли для mAb1 и mAb2 в отношении связывания с антигеном pE2-E1 CHIKV, полученным из штаммов LR2006 (фиг. 5A) и SL15649 (фиг. 5B) CHIKV соответственно. Связывание измеряли соответственно для

mAb1 и mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 и mAb7, содержащих соответственно аланин в положении 434, аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно и тирозин в положении 252, трео-

нин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256;

mAb2 и mAb8, mAb9, mAb11, mAb13 и mAb14, содержащих соответственно тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, глутамин в положении 12 его CDRH3, тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, а также глутамин в положении 12 его CDRH3, лейцин в положении 428 и серин в положении 434, а также глутамин в положении 12 его CDRH3.

Ни одна из замен в Fc-области, которые обеспечивали усиленное связывание mAb1 и mAb2 с FcRn, не влияла на связывание с нацеливаемым антигеном pE2-E1 CHIKV.

Пример 4. Связывание FcγRIIIa.

Результаты представлены на фиг. 6. Влияния замен в Fc-области mAb1 и mAb2 измеряли в отношении связывания с FcγRIIIa соответственно. FCγRIIa (CD16a) экспрессируется NK и макрофагами и способен вызывать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и высвобождение цитокинов макрофагами.

Результаты связывания показаны в отношении высокоаффинного рецептора FcγRIIIa человека (FcγRIIIaV158) для mAb1 (фиг. 6A) и для mAb2 (фиг. 6B), а также в отношении низкоаффинного рецептора FcγRIIIa человека (FcγRIIaF158) соответственно для mAb1 (фиг. 6C) и для mAb2 (фиг. 6D).

Связывание измеряли соответственно для

mAb1 и mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 и mAb7, содержащих соответственно аланин в положении 434, аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно и тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256;

mAb2 и mAb8, mAb9, mAb11, mAb13 и mAb14, содержащих соответственно тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, глутамин в положении 12 его CDRH3, тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, а также глутамин в положении 12 его CDRH3, лейцин в положении 428 и серин в положении 434, а также глутамин в положении 12 его CDRH3.

Среди замен в Fc-области mAb1 и mAb2, которые обеспечивали усиленное связывание FcRn, тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовая кислота в положении 256 привели к снижению аффинности связывания FcγRIIIa, что может оказывать отрицательное влияние на клеточно-опосредованные эффекторные функции и терапию против CHIKV по сравнению с mAb1 или mAb2 с Fc-областями без замен. Другие мутации, такие как аланин в положении 434, аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428, лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, обеспечивали сохранение аффинности связывания в отношении FcγRIIIa.

У mAb1 и mAb2, содержащих аланин в положении 434, аланин в положениях 307, 380 и 434 соответственно, или глутамин в положении 250 и лейцин в положении 428, или лейцин в положении 428 и серин в положении 434 соответственно, но не тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, сохранялась способность связывания FcγRIIIa, которая ассоциирована с эффекторными функциями.

Следовательно, mAb1 или mAb2, содержащие лейцин в положении 428 и серин в положении 434, демонстрировали наиболее подходящее связывание FcRn с сохранением при этом связывания FcγRIIIa, которые ассоциированы с эффекторными функциями.

Таблица 6. Кратности улучшения K_D в отношении связывания FcRn mAb1 с Fc-областью, несущей одну или несколько замен, или без нее

	Лиганд	K_D (нМ)	Увеличение аффинности (кратность)	Лиганд	K_D (нМ)	Увеличение аффинности (кратность)	Лиганд	K_D (нМ)	Лиганд	K_D (нМ)
mAb1	FcRn человека	348	1,0	FcRn мыши	20	1,0	Антиген (E2)	0,13	hFcγRIII	179
mAb7		15	23,8		5,9	3,4		0,17		169
mAb6		21	16,3		1,9	10,4				381
mAb5		27	13,0		5,9	3,3				236
mAb4		31	11,3		8,4	2,3				180
mAb3		45	7,7		9,3	2,1				199

Таблица 7. Кратности улучшения K_D в отношении связывания FcRn mAb2 и mAb2, несущим замену в CDRH3, с Fc-областью, несущей одну или несколько замен, или без нее

	Лиганд	K_D (нМ)	Увеличение аффинности (кратность)	Лиганд	K_D (нМ)	Увеличение аффинности (кратность)	Лиганд	K_D (нМ)	Лиганд	K_D (нМ)
mAb2	FcRn человека	328	1,0	FcRn мыши	22	1,0	Антиген (E2)	0,13	hFcγRIII	262
mAb9		20	16,6		7,5	3,0		0,25		207
mAb8		23	14,1		1,2	19,5				499
mAb11		301	1,1		20	1,1		0,22		289
mAb14		18	18,2		6,2	3,6		0,12		187
mAb13		24	13,7		1,6	13,7				387
mAb12								0,50		
mAb10								0,94		

Пример 5. Нейтрализующая активность mAb с применением стандартного анализа снижения бляшкообразования.

MAb1, mAb7 и mAb CTR (контрольное антитело rhIgG1 к лизоциму) тестировали in vitro в отношении 3 различных прототипных штаммов CHIKV (штаммы Карибского бассейна, Реюньона (LR) и 37997), которые представляют три линии CHIKV (азиатскую, восточно-центральную и южноафриканскую (ESCA) и западноафриканскую линии).

Заданное количество вируса смешивали с равным объемом антитела, разбавленным в PBS, или с разбавителем. Смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Затем смесь добавляли к слившимся монослоям клеток vero в 6-луночных планшетах. После 2-часовой инкубации планшеты покрывали CMC в 5% DMEM. Планшеты фиксировали формалином через 48 часов после введения и затем окрашивали метиленовым синим красителем. Подсчитывали бляшки и данные анализировали в Prism-Graph Pad для определения EC_{50}.

Результаты представлены в табл. 8 ниже, а также на фиг. 7A-7C. MAb1 и mAb7 ингибировали вирусы всех трех генотипов с чрезвычайно сильной активностью (значения $EC_{50<10}$ нг/мл для mAb1 и < 1 нг/мл для mAb7) на азиатской, восточно-центральной и южноафриканской (ESCA) и западноафриканской линиях CHIKV, как показано на фиг. 7A, 7B и 7C соответственно. Антитело к лизоциму (mAb CTR) использовали в качестве неспецифического отрицательного контроля.

Таблица 8

Генотип CHIKV	Нейтрализация in vitro – EC_{50} (нг/мл)		
	mAb CTR	mAb1	mAb7
Штамм Карибского бассейна азиатской линии	н.д.	7,6	0,6
Штамм LR ECSA линии	н.д.	3,9	0,3
Штамм 37997 западноафриканской линии	н.д.	4,8	0,2

Пример 6. Исследования защиты in vivo на мышах.

Исследования in vivo на модели мышей DBA1/J проводили в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных Национального института

здравоохранения. Протоколы были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Национального института аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID). Эксперименты по инфицированию проводили в лабораториях A-BSL3 с одобрения комитета по исследованиям на животных NIAID.

Мышам DBA/1J возрастом 7-8 недель инокулировали по 0,05 мл CHIKV-LR2006 подкожно в подушечку стопы около лодыжки правой задней конечности. Для терапевтических исследований одну дозу отдельных mAb к CHIKV на основе рекомбинантного IgG человека в установленных дозах вводили внутрибрюшинным путем через 3 дня после инфицирования CHIKV с помощью подкожной инокуляции в подушечку стопы $10^{5,5}$ $CCID_{50}$/0,1 мл CHIKV-LR2006. Титр вируса в месте инъекции измеряли через 5 дней после инфицирования. Для исследований профилактики mAb к CHIKV на основе рекомбинантного IgG человека вводили путем внутрибрюшинной инъекции за 2,7 или 14 дней до инфицирования путем подкожного введения в подушечку стопы $10^{5,5}$ $CCID_{50}$/0,l мл CHIKV-LR2006. Титр вируса в месте инъекции измеряли через 3 дня после инфицирования.

Обеспечиваемая mAb профилактика in vivo.

Мышей предварительно обрабатывали однократной дозой 250 мкг (~12,5 мг/кг) mAb к CHIKV на основе рекомбинантного hIgG (mAb1, mAb7) или mAb к лизоциму в качестве изотипического контроля (mAb_{CTR}) за 2, 7 или 14 дней до подкожной инъекции CHIKV-LR2006. Все мыши, обработанные mAb изотипического контроля, демонстрировали высокий титр вируса в правой задней конечности ($CCID_{50}$/г ткани) через 3 дня после инокуляции (фиг. 8). Предварительная обработка как mAb7, так и mAb1 в разные моменты времени до инфицирования (от -2 до -14 дней) обеспечивали полную защиту у мышей DBA1/J от вирусной нагрузки в месте инъекции, поскольку их соответствующий уровень вируса в правой задней конечности был сопоставим с таковым у неинфицированных мышей из группы SHAM-PBS.

Терапия посредством mAb после воздействия возбудителя in vivo.

Мышам DBA/1J возрастом 7-8 недель инокулировали по 0,05 мл $10^{5,5}$ $CCID_{50}$/0,1 мл CHIKV-LR подкожно в подушечку стопы около лодыжки правой задней конечности. Однократную дозу 250 мкг отдельных mAb (mAb1, mAb2, mAb7, mAb11 или mAb14) вводили внутрибрюшинным путем через 3 дня после инфицирования CHIKV. Титр вируса в месте инъекции измеряли через 5 дней после инфицирования. Все тестируемые mAb продемонстрировали одинаковую активность в отношении нейтрализации вирусной нагрузки в ткани на мышиной модели инфекции CHIKV (фиг. 9A). MAb7 и mAb14 дополнительно характеризовали в исследовании подбора дозы. С этой целью мышам DBA1/J инокулировали по 0,05 мл $10^{5,5}$ $CCID_{50}$/0,1 мл CHIKV-LR2006 подкожно в подушечку стопы около лодыжки правой задней конечности. MAb7 или mAb14 вводили через 3 dpi посредством однократной внутрибрюшинной инъекции в дозах 10, 25, 50, 100 и 250 мкг (~0,5, 1, 2,5, 5, 12,5 мг/кг). Первичным результатом был титр вируса в задней конечности в месте заражения вирусом через 5 dpi. MAb7 обеспечивало снижение титра вируса в суставе у мышей DBA/1J, инфицированных CHIKV, дозозависимым образом (фиг. 9B). Значительное снижение наблюдалось при дозе от 50 до 250 мкг, при этом максимальный эффект достигался при наиболее высокой дозе. MAb14 обеспечивало значительное снижение титра вируса независимо от дозы, однако в тестируемых условиях не наблюдалась зависимость эффекта от дозы.

Пример 7. Фаумакокинетические характеристики mab у приматов, отличных от человека.

MAb1 и mAb7 вводили внутривенно (IV) болюсно в дозе 2,5 мг/кг самцу макака-крабоеда (Macaca fascicularis). Животные, получавшие mab1 и mab7, были разными (два отдельных исследования). Образцы плазмы крови анализировали с помощью исследовательского биоаналитического способа Elisa с применением антител к IgG1 человека и, таким образом, распознавали mAb1 и mAb7, полученные с помощью иммунизации кроликов. Сравнение фармакокинетических характеристик показало увеличение конечного периода полужизни (т.е. $t_{1/2}$, периода времени, необходимого для снижения концентрации или количества лекарственного средства в организме ровно наполовину), при этом он составлял 22,7 и 25,5 дня для mAb1 и mAb7 соответственно (фиг. 10).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с CHIKV, и которое содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), где

указанные CDRH имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и указанные CDRL имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, GNT и 10,

где указанное антитело дополнительно содержит Fc-область, содержащую остатки, выбранные из группы, состоящей из:

i. аланина в положении 434,

ii. аланина в положениях 307, 380 и 434 соответственно,

iii. глутамина в положении 250 и лейцина в положении 428 соответственно,

iv. лейцина в положении 428 и серина в положении 434 соответственно, и

v. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256

соответственно,

где указанные положения аминокислот в Fc-области приведены в соответствии с EU-индексом, как изложено в Kabat.

2. Выделенное моноклональное антитело по п.1, где указанное антитело характеризуется одним или несколькими из следующих свойств:

i. связывается с мишенью pE2-E1 CHIKV с константой равновесия связывание-диссоциация (K_D), составляющей менее 10 нМ,

ii. связывается с FcRn человека с K_D, составляющей менее 200 нМ,

iii. связывается с FcγRIII человека с K_D, составляющей менее 600 нМ.

3. Моноклональное антитело по любому из пп.1 или 2, где указанная Fc-область содержит остатки, выбранные из группы, состоящей из

i. лейцина в положении 428 и серина в положении 434, или

ii. тирозина в положении 252, треонина в положении 254 и глутаминовой кислоты в положении 256 соответственно,

где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом, как изложено в Kabat.

4. Моноклональное антитело по любому из пп.1-3, где указанная Fc-область содержит лейцин в положении 428 и серин в положении 434, где указанные положения аминокислот приведены в соответствии с EU-индексом, как изложено в Kabat.

5. Моноклональное антитело по п.1 или 2, где указанная Fc-область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 и 63.

6. Моноклональное антитело по любому из пп.1-5, где вариабельная область его тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

7. Моноклональное антитело по любому из пп.1-6, где вариабельная область его легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

8. Моноклональное антитело по любому из пп.1-7, где его тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 31.

9. Моноклональное антитело по любому из пп.1-8, где его легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 20.

10. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с CHIKV и которое содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 31 и легкую цепь с SEQ ID NO: 20.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело по любому из пп.1-10 и по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

12. Способ получения моноклонального антитела по любому из пп.1-10, где указанный способ включает стадии:

i. культивирования линии клеток, продуцирующей указанное моноклональное антитело, и

ii. очистки полученного моноклонального антитела.

13. Полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую моноклональное антитело по любому из пп.1-10.

14. Полинуклеотид по п.13, где полинуклеотид по меньшей мере на 80% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 и 32.

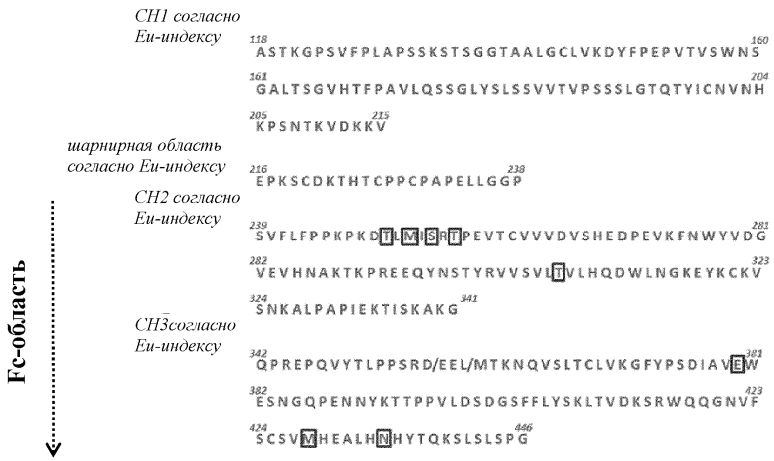
15. Набор для лечения инфекции CHIKV, отличающийся тем, что содержит антитело по любому из пп.1-10.

16. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.13 или 14.

17. Способ лечения инфекции CHIKV у пациента, где способ включает введение пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-10.

18. Способ профилактики инфекции CHIKV у пациента, где способ включает введение индивиду эффективного количества антитела по любому из пп.1-10.

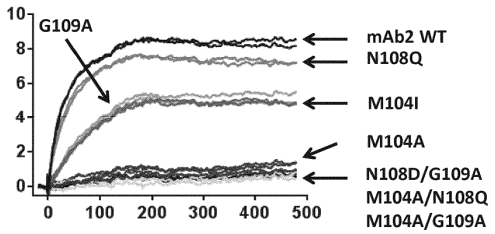
19. Лекарственное средство, содержащее эффективное количество антитела по любому из пп.1-10.



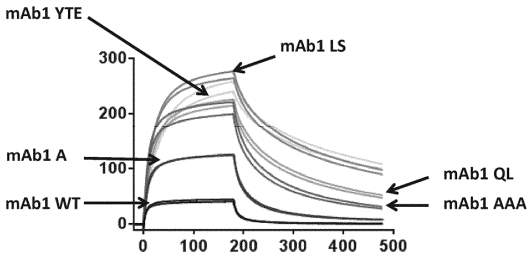
Фиг. 1

```
IgG1_Fc-область_YTE_SEQ_ID_NO: 62   CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
IgG1_Fc-область_QL_SEQ_ID_NO: 61    CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
IgG1_Fc-область_AAA_SEQ_ID_NO: 60   CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
IgG1_Fc-область_SEQ_ID_NO: 17       CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
IgG1_Fc-область_A_SEQ_ID_NO: 59     CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
IgG1_Fc-область_LS_SEQ_ID_NO: 63    CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
                                    ************************ * *:* ******************************

IgG1_Fc-область_YTE_SEQ_ID_NO: 62   NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
IgG1_Fc-область_QL_SEQ_ID_NO: 61    NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
IgG1_Fc-область_AAA_SEQ_ID_NO: 60   NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
IgG1_Fc-область_SEQ_ID_NO: 17       NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
IgG1_Fc-область_A_SEQ_ID_NO: 59     NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
IgG1_Fc-область_LS_SEQ_ID_NO: 63    NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
                                    ********************:************************************

IgG1_Fc-область_YTE_SEQ_ID_NO: 62   PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
IgG1_Fc-область_QL_SEQ_ID_NO: 61    PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
IgG1_Fc-область_AAA_SEQ_ID_NO: 60   PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
IgG1_Fc-область_SEQ_ID_NO: 17       PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
IgG1_Fc-область_A_SEQ_ID_NO: 59     PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
IgG1_Fc-область_LS_SEQ_ID_NO: 63    PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
                                    ********************************** *************************

IgG1_Fc-область_YTE_SEQ_ID_NO: 62   LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_Fc-область_QL_SEQ_ID_NO: 61    LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_Fc-область_AAA_SEQ_ID_NO: 60   LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLSPG
IgG1_Fc-область_SEQ_ID_NO: 17       LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_Fc-область_A_SEQ_ID_NO: 59     LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLSPG
IgG1_Fc-область_LS_SEQ_ID_NO: 63    LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
                                    ***********************:****** ************
```

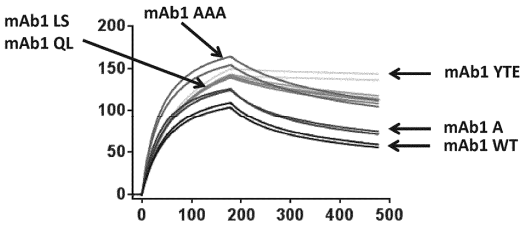
Фиг. 2



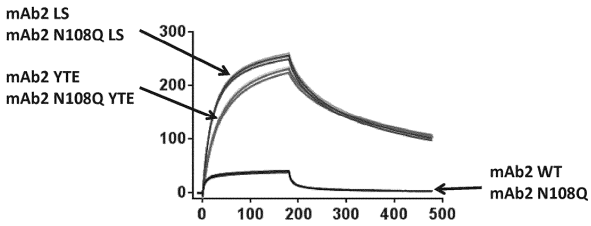
Фиг. 3



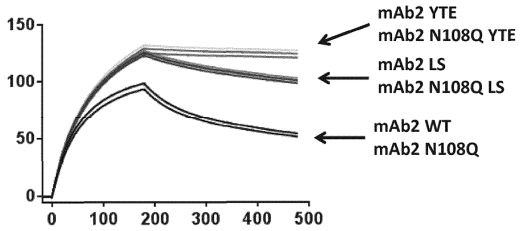
Фиг. 4A



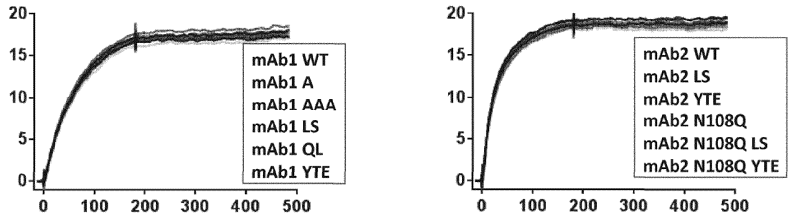
Фиг. 4B



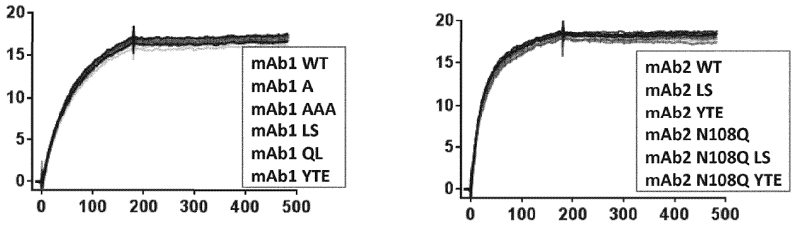
Фиг. 4C



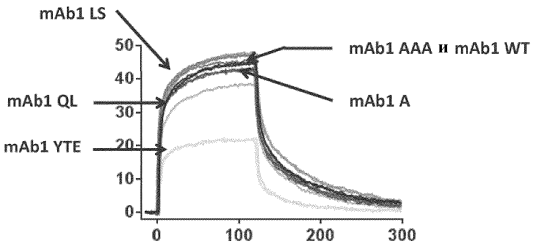
Фиг. 4D



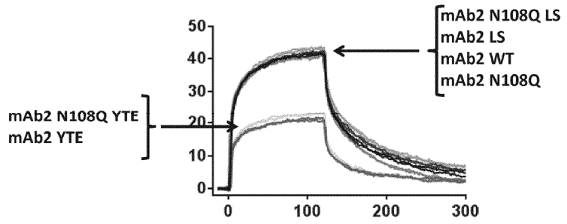
Фиг. 5A



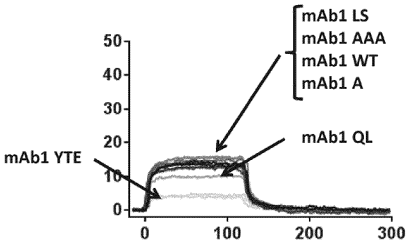
Фиг. 5B



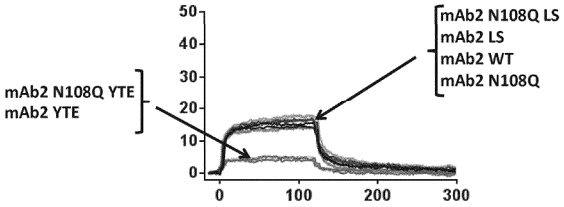
Фиг. 6A



Фиг. 6B



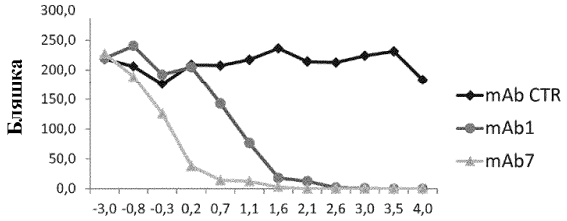
Фиг. 6C



Фиг. 6D

Анализ нейтрализации in vitro

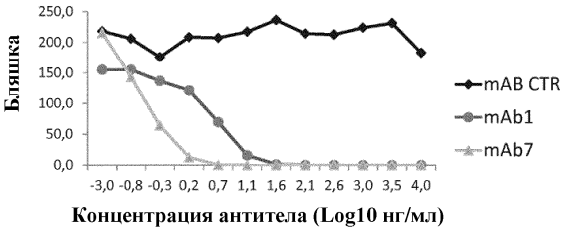
Штамм Карибского бассейна азиатской линии CHIKV



Фиг. 7A

Анализ нейтрализации in vitro

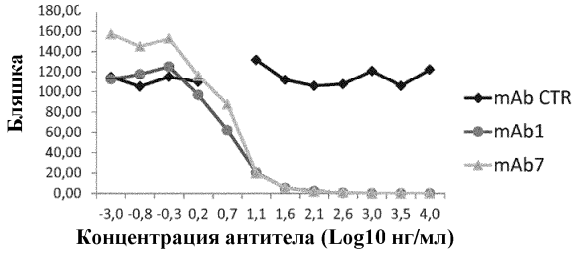
Штамм Реюньона ECSA линии CHIKV



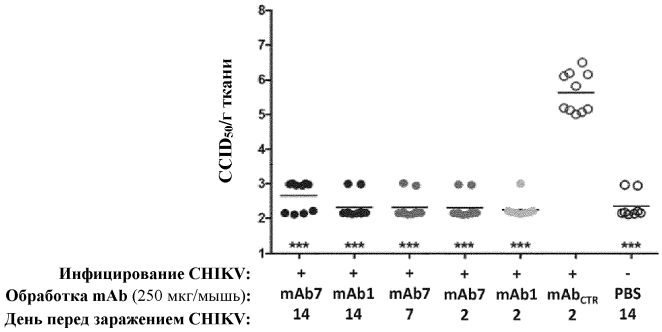
Фиг. 7B

Анализ нейтрализации in vitro

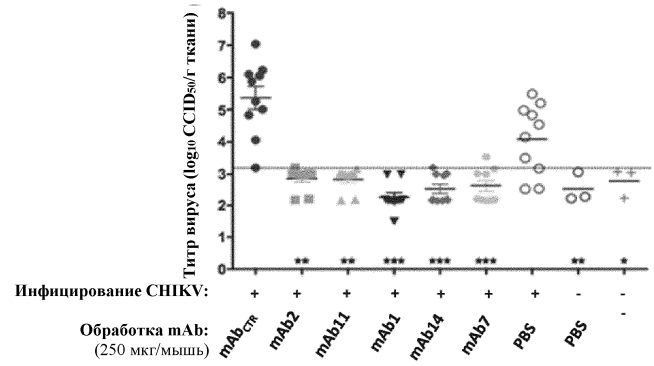
Штамм 37997 западноафриканской линии CHIKV



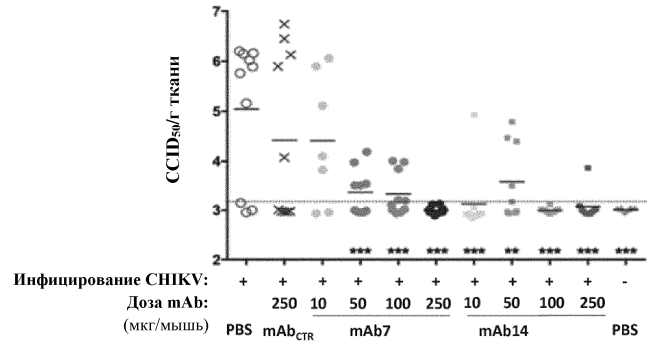
Фиг. 7C



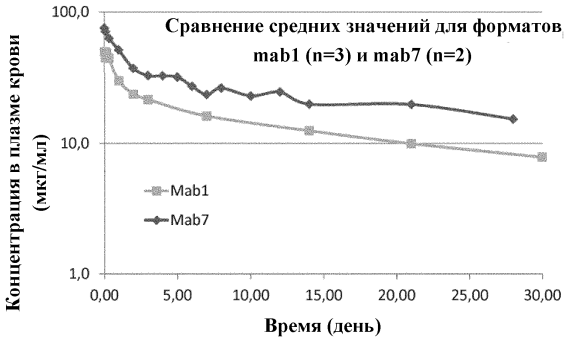
Фиг. 8



Фиг. 9A



Фиг. 9B


Сравнение средних значений для форматов
mab1 (n=3) и mab7 (n=2)
Концентрация в плазме крови (мкг/мл)
100,0
10,0
1,0
Mab1
Mab7
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
Время (день)

Фиг. 10