

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292587** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.02.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.21

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К CD89 ЧЕЛОВЕКА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **20170723.9**

(32) **2020.04.21**

(33) **EP**

(86) **PCT/NL2021/050259**

(87) **WO 2021/215919 2021.10.28**

(71) Заявитель:
**ДЖЕЙДЖЕЙПИ БИОЛОДЖИКС СП.
З О.О. (PL)**

(72) Изобретатель:

**Симонс Петрус Йоханнес, Ден Хартог
Марсель Теодорус, Бун Луис (NL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению раскрыто гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека (Fc α RI человека) на клетках, экспрессирующих CD89 человека, что предотвращает связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками. Согласно настоящему изобретению также раскрыто применение таких антител в борьбе с определенными заболеваниями.

202292587
A1

202292587

A1

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К CD89 ЧЕЛОВЕКА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к области антител и применению таких антител. Указанные антитела особенно полезны для предотвращения связывания IgA человека с CD89 человека. Указанные антитела особенно полезны для нацеливания на эффекторные клетки человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Рецепторы частей Fc (FcR) иммуноглобулина присутствуют на различных типах иммунных клеток и обеспечивают связь между гуморальной и клеточной ветвями иммунной системы. Взаимодействие между антителами и FcR придает клеткам, экспрессирующим FcR, свойства антигенспецифичного распознавания. Взаимодействие может инициировать различные ответы, в том числе эндоцитоз, фагоцитоз, трансцитоз, экзоцитоз, образование супероксида, антителозависимую клеточную цитотоксичность и
15 высвобождение цитокиновых медиаторов воспаления. Рецепторы иммуноглобулинов и их роль в иммунологических ответах широко изучаются.

В настоящее время известно пять классов константных областей антител, а именно IgG, IgA, IgD, IgE и IgM. IgA играет роль во врожденной иммунной системе. Он участвует
20 в предотвращении проникновения микроорганизмов и чужеродных белков через поверхности слизистых оболочек. IgA также способен нейтрализовать токсины и инфекционные организмы. Кроме того, IgA обладает противовоспалительными свойствами и способен ингибировать такие функции как индуцированное IgG высвобождение цитокинов и фагоцитоз.

25 Различные классы константных областей антител могут взаимодействовать с разными рецепторами Fc. Рецептор Fc, который может связывать IgA, представляет собой CD89. CD89 человека способен связываться с константной областью тяжелой цепи IgA1 человека и IgA2 человека. CD89 представляет собой гликозилированный трансмембранный рецептор и также известен как FcαRI. CD89 имеет два внеклеточных
30 домена, EC1 и EC2, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Взаимодействие CD89 с IgA опосредуется внеклеточным доменом EC1. В качестве референсной последовательности мы ссылаемся на NP_001991.1 (предшественник изоформы альфа-рецептора Fc иммуноглобулина). Ссылка сделана исключительно для идентификации

гена/белка CD89 человека. Она не предназначена для ограничения CD89 человека, описанного в настоящем документе, конкретной последовательностью записи в базе данных. Природные варианты CD89 человека включены в объем настоящего изобретения. Рекомбинантный CD89 человека также включен в объем настоящего изобретения, если он
5 может связывать IgA и может связывать антитело, описанное в настоящем документе. CD89 присутствует на клеточной поверхности клеток миелоидного происхождения, включая нейтрофилы, эозинофилы и большинство моноцитов и макрофагов. Однако рецептор не появляется на тучных клетках и кишечных макрофагах. Обнаружено, что экспрессия CD89 является конститутивной и не зависит от присутствия лиганда IgA.

10 CD89 может взаимодействовать с мономерным IgA, полимерным IgA и комплексами IgA. Полагают, что мономерный IgA временно связывается с CD89, в то время как полимерный IgA и комплексы IgA avidно связываются с CD89. CD89 может играть роль как в про-, так и в противовоспалительных ответах. Чтобы ответить на связывание IgA, рецептор должен связаться с другим фактором, который в основном представляет собой
15 димерную форму γ -цепи FcR. Связывание лиганда с CD89 может инициировать ряд биологических процессов. Клеточные функции, стимулируемые связыванием лиганда с CD89, также зависят от связанной γ -цепи FcR.

Перекрестное связывание рецепторов CD89 на клетке может быть достигнуто путем связывания антител IgA, иммунных комплексов IgA или антител к CD89. Перекрестное
20 связывание запускает иммунологический ответ, который может иметь положительные и отрицательные эффекты в зависимости от обстоятельств и, в частности, от связывания. CD89-специфичные антитела можно применять в качестве инструмента/лекарственного средства для модуляции иммунологического ответа. Например, индивидуум, страдающий хроническими воспалительными заболеваниями, может получить пользу от способов
25 ингибирования иммунных ответов. Рецептор CD89 экспрессируется на различных типах клеток, включая нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и макрофаги. Лечение антителами к CD89 может быть особенно полезным для индивидуумов, страдающих заболеваниями, связанными с CD89-экспрессирующими клетками, и/или заболеваниями, связанными с IgA. В настоящее время не существует известного лечения заболеваний, связанных с
30 нейтрофилами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело к CD89 человека, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную
35 последовательность:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGGLEX₁VX₂T
IX₃GX₄GDITYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY
DYDYAMDYWG QGTLVTVSS

в которой:

5 X₁ представляет собой L или W

X₂ представляет собой A или S

X₃ представляет собой N, S

X₄ представляет собой Q, T или N,

причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит 0, 1, 2 или 3 вариации,

10 вставки, делеции, замены, добавления аминокислот по отношению к указанной
аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от X₁,
X₂, X₃ и X₄,

и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKZ₁Z₂KLLIYY

15 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTDZ₃TLTISSLQP EDFATYZ₄CQQ GKTLPYTFGQ GTKLEIK

в которой:

Z₁ представляет собой A или T

Z₂ представляет собой V или P

Z₃ представляет собой Y или F

20 Z₄ представляет собой Y или F,

причем указанная переменная область легкой цепи содержит 0, 1, 2 или 3 вариации,

вставки, делеции, замены, добавления аминокислот по отношению к указанной
аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от Z₁,
Z₂, Z₃ и Z₄.

25 Согласно предпочтительному варианту реализации X₁ представляет собой L, X₂
представляет собой A, X₃ представляет собой S, X₄ представляет собой T, Z₁ представляет
собой A, Z₂ представляет собой V, Z₃ представляет собой Y и Z₄ представляет собой Y.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации X₁ представляет собой L, X₂
представляет собой A, X₃ представляет собой S, X₄ представляет собой Q, Z₁ представляет
30 собой A, Z₂ представляет собой V, Z₃ представляет собой Y и Z₄ представляет собой Y.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое
может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее тяжелую цепь с
аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138 или 139 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и легкую цепь с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Антитело, описанное в настоящем документе, может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками.

Согласно дополнительному аспекту антитело, описанное в настоящем документе, может связываться с внеклеточной частью CD89 человека на клетках HEK293F, экспрессирующих CD89 человека. Депозит клеток HEK293F, экспрессирующих CD89 человека, согласно Будапештскому договору депонирован Депонентом Swiss Pharma International AG, Вальдманштрассе 8, 8001 Цюрих, Швейцария под ссылкой депонентов 293F CG89 клон 2 в Институте Лейбница DSMZ-Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур GmbH (DSMZ) (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Брауншвейг, Германия, которому был присвоен номер доступа: DSM ACC3341.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, раскрытое в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в настоящем документе. Также предложена нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область, раскрытую в настоящем документе, предпочтительно переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи гуманизованного антитела к CD89 человека, описанного в настоящем документе.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе. Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена клетка (клетка-хозяин), содержащая антитело, молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектор, раскрытый в настоящем документе. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, насекомого, растения, бактериальную или дрожжевую клетку. Более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NSO или клетку PER-C6TM (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC) 96022940; WO1997000326; Pau et al., 2001. Vaccine 19: 2716-2721).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела, раскрытого в настоящем документе. Способ предпочтительно включает сбор антитела. Предпочтительно антитела получают с использованием клетки и собирают из

указанной клетки. Предпочтительно указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NSO или клетку PER-C6™. Согласно другому предпочтительному варианту реализации антитела получают синтетическим путем.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая раскрытое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту и/или клетку. Предпочтительно композиция или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в настоящем документе, предназначены для применения в изготовлении лекарственного средства. Предпочтительно лекарственное
10 средство предназначено для лечения или профилактики хронических воспалительных заболеваний.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения хронических воспалительных заболеваний у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или его
15 антигенсвязывающего фрагмента, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении хронических воспалительных заболеваний.

20 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать или связывает внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать или предотвращает связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и не снижает клеточную жизнеспособность указанных клеток
25 более чем на 60% после инкубации в течение ночи при 37°C. Изменения жизнеспособности или экспрессии после инкубации в течение ночи при 37°C, как указано в настоящем документе, предпочтительно относятся к изменениям относительно контрольных значений, предпочтительно при инкубации в тех же условиях, но без указанного антитела. Указанные эксперименты на жизнеспособность предпочтительно
30 выполняют в подходящей среде, такой как бессывороточная среда.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и
35 которое не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток более чем на 20%

после инкубации в течение ночи при 37°C по сравнению с этими же клетками, инкубированными в тех же условиях, но без указанного антитела.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, при 37°C в отсутствие NaN₃, и которое не может вытеснять мономерный IgA человека или термоагрегированный IgA, когда оно связано с указанными клетками, при 4°C в присутствии NaN₃.

10 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с рекомбинантной молекулой CD89 человека, в которой аминокислоты 22-46 CD89 человека заменены аминокислотами 22-46 CD89 яванской макаки.

15 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 47-71 CD89 человека
20 заменены аминокислотами 47-71 CD89 яванской макаки.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20%
25 или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 72-96 CD89 человека заменены аминокислотами 72-96 CD89 яванской макаки.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и связывание которого не
30 снижается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 97-121 CD89 человека заменены аминокислотами 97-121 CD89 яванской макаки.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89
35 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека,

когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 58; 59; 73; 74; 76; 106 и 107 CD89 человека заменены аминокислотами 58; 59; 73; 74; 76; 106 и 107, соответственно, CD89 яванской макаки.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 29-31 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, 10 имеющей SEQ ID NO: 32-34 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 с 0, 1, 2, 3, 15 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое 20 может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 45-47 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 48-50 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или 25 добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и 30 вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область 35 тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 69-71 с

0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 72-74 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

5 Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:
10 68 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 77-79 с
15 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 80-82 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:
20 76 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 53-55 с
0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и
30 вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 56-58 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную
35 область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51 с 0, 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, предпочтительно антитело может связывать внеклеточный домен EC1 CD89.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

10 **Фигура 1.** Связывание мышиных антител к CD89 человека (супернатанты) с мембраносвязанным полноразмерным CD89 человека на клетках НЕК293F с использованием проточной цитометрии. Пунктирная линия представляет собой фон (т.е. отсутствие связывания мышиных антител к CD89 человека). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$).

15 **Фигура 2.** Влияние мышиных антител к CD89 человека (супернатанты) на связывание сывороточного IgA человека с rhuCD89 (A, ИФА) или с мембраносвязанным CD89 человека (B, FACS) на клетках НЕК293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$).

20 **Фигура 3.** Характеристики связывания очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека с rhuCD89 (A, ИФА) или с мембраносвязанным CD89 человека (B, FACS) на клетках НЕК293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$).

25 **Фигура 4.** Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека на связывание сывороточного IgA человека с rhuCD89 (A, ИФА) или с мембраносвязанным CD89 человека (B, FACS) на клетках НЕК293F. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека на связывание секреторного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека (C) на клетках НЕК293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$).

30 **Фигура 5.** Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека (при 10 мкг/мл) на (A, C) предотвращение связывания неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека с клетками НЕК293F, экспрессирующими мембраносвязанный CD89 человека, на (B, D) вытеснение ранее насыщенного неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на указанных клетках и на (E) индукцию клеточной гибели указанных клеток (жизнеспособность клеток и экспрессия фосфатидилсерина). Влияние блокирующих
35 CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека исследовали (A, B) в метаболически

неактивных условиях (т.е. в присутствии NaN_3 и при низкой температуре окружающей среды (4°C)) и (C, D, E) в метаболически активных условиях (т.е. в отсутствие NaN_3 и при физиологической температуре окружающей среды (37°C)). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$).

5 **Фигура 6.** Влияние прототипных коммерческих мышинных антител к CD89 человека, клона MIP8a, клона A59 и клона A3, на предотвращение/ингибирование связывания неагрегированного (A) или термоагрегированного (B) сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека на клетках HEK293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$).

10 **Фигура 7.** Связывание очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека (при 10 мкг/мл) с мембраносвязанным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека (A; среднее значение \pm стандартное отклонение от 5 разных здоровых доноров), на клетках HEK293F (B; среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$)), и на моноцитарных клетках U937 (C; среднее значение \pm стандартное отклонение
15 ($n = 2$)).

Фигура 8. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека на фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека. Пунктирная линия представляет собой фагоцитоз только гранул, покрытых IgA
20 (т.е. без добавления антител). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$) от 3 разных здоровых доноров (1, 2 и 3).






Фигура 9. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека (при 20 мкг/мл) (A; среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$)) на двумерную миграцию *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, индуцированную гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, и на (B; среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$)) соответствующую полученную из супернатанта хемотаксическую активность указанных
25 клеток, и (C; $n = 1$) соответствующие полученные из супернатанта уровни хемоаттрактантного LTB4 из указанных клеток. Пунктирные линии представляют (A)
30 двумерную миграцию гранулоцитов, (B) хемотаксис гранулоцитов и (C) продукцию LTB4 гранулоцитами, индуцированную только гранулами сефарозы, покрытыми IgA (т.е. без добавления антител). На (A), (B) и (C) показаны данные от 3 здоровых доноров (1, 2 и 3).
Н/О = не определено.

Фигура 10. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89
35 человека на (A) связывание сывороточного IgA человека с *ex vivo* первичными

нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, и на (B) соответствующую опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию лактоферрина (маркера дегрануляции) из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека. Пунктирные линии представляют собой (A) связывание гранулоцитов только с планшетами, покрытыми IgA, и (B) их соответствующую продукцию лактоферрина, индуцированную только планшетами, покрытыми IgA (т. е. без добавления антител). Среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 2$) показано от 3 здоровых доноров (1, 2 и 3) в (A), (B).








Фигура 11. Перекрестная конкуренция немеченых очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека (при 10 мкг/мл) с ФЭ-конъюгированными коммерческими мышинными антителами к CD89, клоном MIP8a (A; блокатор CD89/IgA), клоном A59 (B; не является блокатором CD89/IgA) и клоном A3 (C; не является блокатором CD89/IgA), с мембраносвязанным CD89 человека на клетках HEK293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (по меньшей мере $n = 2$).

Фигура 12. Детальный анализ перекрестно конкурирующих немеченых очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с ФЭ-конъюгированными коммерческими мышинными антителами к CD89, клоном MIP8a (A; блокатор CD89/IgA), клоном A59 (B; не является блокатором CD89/IgA) и клоном A3 (C; не является блокатором CD89/IgA), с мембраносвязанным CD89 человека на клетках HEK293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (по меньшей мере $n = 2$).

Фигура 13. (A) Схематическое представление CD89 человека дикого типа, бычьего Fc γ 2R дикого типа и полученных из них химерных конструкций человеческого/бычьего FcR. (B) Связывание ($n=1$) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембраносвязанным полноразмерным CD89 человека («EC1-EC2-CD89 человека»; т. е. ) , с мембраносвязанным химерным EC1-CD89 человека/бычьим EC2-Fc γ 2R («EC1-CD89 человека», т. е.  и ) , с мембраносвязанным химерным бычьим EC1-Fc γ 2R/EC2-CD89 человека («EC2-CD89 человека»; т. е. ) и с мембраносвязанным полноразмерным бычьим Fc γ 2R («бычий Fc γ 2R», т. е. ) на клетках HEK293F. (C) Связывание ($n=1$) очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с мембраносвязанным полноразмерным CD89 человека («EC1-EC2-CD89 человека»), с мембраносвязанным химерным EC1-CD89 человека/бычьим EC2-Fc γ 2R («EC1-CD89 человека»), с мембраносвязанным химерным бычьим EC1-Fc γ 2R/EC2-CD89 человека («EC2-CD89 человека») и с мембраносвязанным полноразмерным бычьим Fc γ 2R («бычий

Fcγ2R») на клетках HEK293F. Точечные серые линии представляют собой фон (т. е. отсутствие связывания мышинных антител к CD89 человека).

Фигура 14. (А) Связывание кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембраносвязанным полноразмерным CD89 яванской макаки. (В) Связывание очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с мембраносвязанным полноразмерным CD89 яванской макаки. Точечные серые линии представляют собой фон (т. е. отсутствие связывания мышинных антител к CD89 человека).

Фигура 15. (А) Схематическое представление CD89 человека дикого типа, CD89 яванской макаки дикого типа и полученных из них химерных конструкций CD89 человека/яванской макаки. (В) Связывание (n=1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембраносвязанным полноразмерным CD89 человека («EC1-CD89 человека»; т. е. ) , с мембраносвязанным химерным CD89 человека/яванской макаки-горячие точки («ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека», т. е. ) , с мембраносвязанным химерным CD89-I человека/яванской макаки («ΔGln22 – Lys46 EC1-CD89 человека», т. е. ) , с мембраносвязанным химерным CD89-II человека/яванской макаки («ΔIle47 – Ile71 EC1-CD89 человека», т. е. ) , с мембраносвязанным химерным CD89-III человека/яванской макаки («ΔGly72 – Gly96 EC1-CD89 человека», т. е. ) , с мембраносвязанным химерным CD89-IV человека/яванской макаки («ΔArg97 – Gly121 EC1-CD89 человека», т. е. ) и с мембраносвязанным химерным полноразмерным CD89 яванской макаки («EC1-CD89 яванской макаки», т. е. ) на клетках HEK293F. (С) Связывание (n=1) очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с мембраносвязанным полноразмерным CD89 человека (EC1-CD89 человека), с мембраносвязанным химерным CD89 человека/яванской макаки-горячие точки («ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека»), с мембраносвязанным химерным CD89-I человека/яванской макаки («ΔGln22 – Lys46 EC1-CD89 человека»), с мембраносвязанным химерным CD89-II человека/яванской макаки («ΔIle47 – Ile71 EC1-CD89 человека»), с мембраносвязанным химерным CD89-III человека/яванской макаки («ΔGly72 – Gly96 EC1-CD89 человека»), с мембраносвязанным химерным CD89-IV человека/яванской макаки («ΔArg97 – Gly121 EC1-CD89 человека») и с мембраносвязанным химерным полноразмерным CD89 яванской макаки («EC1-CD89

яванской макаки») на клетках HEK293F. Пунктирные серые линии представляют собой фон (т. е. отсутствие связывания мышинных антител к CD89 человека).

Фигура 16. Характеристики связывания очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека с *ghu*CD89 (А, ИФА) или с мембраносвязанным CD89 человека (В, FACS) на клетках HEK293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2).

Фигура 17. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека на связывание неагрегированного (А) или термоагрегированного (В) сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека на клетках HEK293F. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека на связывание секреторного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека (С) на клетках HEK293F. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2).

Фигура 18. Связывание очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека (при 10 мкг/мл) с мембраносвязанным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека (среднее значение \pm стандартное отклонение от 3 разных здоровых доноров).

Фигура 19. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека на фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека. Пунктирная линия представляет собой фагоцитоз только гранул, покрытых IgA (т. е. без добавления антител). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2) от 3 разных здоровых доноров (1, 2 и 3).

Фигура 20. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека (при 20 мкг/мл) (А; среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3)) на двумерную миграцию *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, индуцированную гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, и на (В; среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3)) их соответствующую полученную из супернатанта хемотаксическую активность указанных клеток и (С; среднее значение \pm стандартное отклонение n=2) их соответствующие полученные из супернатанта уровни хемоаттрактантного LTB₄ из указанных клеток. Пунктирные линии представляют собой (А) двумерную миграцию гранулоцитов, (В) хемотаксис гранулоцитов и (С) продукцию LTB₄ гранулоцитами, индуцированную только гранулами сефарозы, покрытыми IgA (т. е.

без добавления антител). Показаны данные от 2 (В) до 3 ((А) и (С)) здоровых доноров (1, 2 и 3).

Фигура 21. Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека на продукцию лактоферрина (маркера дегрануляции), опосредуемую сывороточным IgA человека, из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека. Пунктирная линия представляет продукцию лактоферрина, индуцированную только планшетами, покрытыми IgA (т. е. без добавления антител). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2) от 2 здоровых доноров (1 и 2).

10 **Фигура 22:** Депозит клеток НЕК293F, экспрессирующих CD89 человека, согласно Будапештскому договору депонирован под номером доступа: DSM ACC3341, и идентификационная ссылка: 293F CD89 клон 2. Депозитные формы: (А) Квитанция в случае первоначального депозита, (В) Заявление о жизнеспособности.

15 **Фигура 23:** Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека на высвобождение внеклеточных нейтрофильных ловушек (NET), индуцированное латексными гранулами, покрытыми сывороточным IgA человека, *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека. Пунктирная линия представляет собой высвобождение NET, индуцированное только гранулами, покрытыми IgA (т. е. без добавления антител). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3) от 8 разных здоровых доноров (1-8).

20 **Фигура 24:** Влияние очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека на индукцию гибели клеток (процентное содержание йодида пропидия (PI)) в непраймированных и ЛПС-праймированных *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=1 или 2) от 3 здоровых доноров (1, 2 и 3).

25 **Фигура 25:** Характеристики связывания (супернатантов) блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 (т. е. гуманизированных вариантов VH1, 2, 3 и VL1, 2, 3, 4, полученных из областей VH и VL блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека 10E7 в комбинации с константными областями IgG4/к человека) с ghuCD89 (А, ИФА) и с мембраносвязанным CD89 человека (В, FACS) на клетках НЕК293F. В качестве референсного использовали блокирующее CD89/IgA химерное антитело к CD89 человека 10E7 (т. е. химеру IgG4/к). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2).

30 **Фигура 26:** Характеристики связывания очищенных вариантов VH3SQVL3 и VH3STVL3 (т. е. гуманизированных вариантов VH3 и VL3, полученных из областей VH и VL

блокирующего CD89/IgA мышиного антитела к CD89 человека 10E7 в комбинации с константными областями IgG4к человека) блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» (т. е. VH3SQVL3 10E7 и VH3STVL3 10E7) гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 с rhuCD89 (А, ИФА) и с мембраносвязанным CD89 человека (В, FACS) на клетках HEK293F. В качестве референсного использовали блокирующее CD89/IgA химерное антитело к CD89 человека 10E7 (т. е. химеру IgG4/к 10E7). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2).

Фигура 27: Влияние очищенных вариантов VH3SQVL3 и VH3STVL3 (т. е. гуманизированных вариантов VH3 и VL3, полученных из областей VH и VL блокирующего CD89/IgA мышиного антитела к CD89 человека 10E7 в комбинации с константными областями IgG4к человека) блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» (т. е. VH3SQVL3 10E7 и VH3STVL3 10E7) гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 на связывание сывороточного IgA человека (А) и секреторного IgA человека (В) с мембраносвязанным CD89 человека на клетках HEK293F. В качестве референсного использовали блокирующее CD89/IgA химерное антитело к CD89 человека 10E7 (т. е. химеру IgG4/к 10E7). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2).

Фигура 28: Связывание очищенных вариантов VH3SQVL3 и VH3STVL3 (при 10 мкг/мл) блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 с мембраносвязанным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека (среднее значение \pm стандартное отклонение от 3 разных здоровых доноров).

Фигура 29: Влияние очищенных вариантов VH3SQVL3 и VH3STVL3 блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 на фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека. Пунктирная линия представляет собой фагоцитоз только гранул, покрытых IgA (т. е. без добавления антител). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение (n=2) от 3 разных здоровых доноров (1, 2 и 3).

Фигура 30: Влияние очищенных вариантов VH3SQVL3 и VH3STVL3 блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 на опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию лактоферрина (маркера дегрануляции) из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека.

Пунктирная линия представляет собой продукцию лактоферрина, индуцированную только планшетами, покрытыми IgA (т. е. без добавления антител). Показано среднее значение \pm стандартное отклонение ($n=2$) от 5 здоровых доноров (1-5).

Фигура 31: (А) Экспериментальные условия модели LABD на мышях *in vivo* и схема
5 лечения блокирующим CD89/IgA мышинным антителом к CD89 человека 10E7. (В)
Влияние *in vivo* очищенного блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89
человека 10E7 на индуцированный антителом IgA человека к мышинному коллагену XVII
приток нейтрофильных гранулоцитов мышцы, экспрессирующих CD89 человека, в месте
инъекции. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение. Черные круги и черные
10 квадраты представляют собой инъекции фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в левые уши и
инъекции IgA человека к мышинному коллагену XVII в правые уши каждой отдельной
мышцы, соответственно. $*P<0,05$ (двусторонний непарный *t*-критерий Стьюдента);
н/д=недостаточно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 В настоящем раскрытии описаны антитела, которые могут связывать внеклеточную
часть CD89 человека (Fc α RI человека) на клетках, экспрессирующих CD89 человека.
Антитело, описанное в настоящем документе, можно применять для предотвращения
связывания IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с
указанными клетками. Было создано несколько антител, которые могут связываться с
20 рецептором CD89. Полагают, что моноклональные антитела, которые связываются с
доменом EC1 CD89, могут блокировать связывание IgA, в то время как антитела, которые
связываются с доменом EC2, не предотвращают связывание IgA с рецептором. Антитела,
которые специфично создают помехи для IgA-связывающего сайта на CD89, известны в
данной области техники. Например, антитела MIP8a, 2D11 или MY43, описанные в Morton
25 et al., J. Exp. Med. 1999 Jun 7;189(11):1715-22 и Shen L.A., J Leukoc Biol. 1992 Apr;51
(4):373-8. MIP8a представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое
связывается с CD89 человека и имеет константную область IgG1 мыши. Антитела,
которые могут связывать CD89, например, MIP8a, могут индуцировать гибель
нейтрофилов (Wehrli et al., J Immunol. 2014 Dec 1;193(11):5649-59).

30 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены новые
гуманизированные антитела, которые могут связывать внеклеточную часть CD89 человека
(Fc α RI человека) на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которые могут
предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело
связано с указанными клетками.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены новые антитела, которые могут связывать внеклеточную часть CD89 человека (Fc α RI человека) на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которые могут предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и
5 которые индуцируют меньшую клеточную гибель клеток, экспрессирующих CD89 человека, по сравнению с антителом MIP8a.

Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «тяжелую» (H) цепь и одну «легкую» (L) цепь. Легкие цепи человека классифицируются
10 как каппа (κ) и лямбда (λ). Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константные области тяжелой цепи IgD, IgG и IgA состоят из трех доменов, CH1,
15 CH2 и CH3, и константные области тяжелой цепи IgM и IgE состоят из четырех доменов, CH1, CH2, CH3 и CH4. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с
20 тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки). Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными участками (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и
25 четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области легкой и тяжелой цепи вместе образуют сайт связывания антитела и определяют специфичность в отношении эпитопа. В данной области техники известны различные методы отнесения аминокислот к области или домену в антителе. Хорошо известные методы включают метод Kabat и метод
30 Chothia (Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991); Chothia et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions в Nature 1989; 342(6252):877-83). Отнесение аминокислот к каждой области или домену настоящего раскрытия соответствует определениям Kabat.

Термин «антитело» включает мышинные, гуманизированные, деиммунизированные,
35 человеческие и химерные антитела, а также антитело, которое представляет собой

мультимерную форму антител, например, димеры, тримеры или мультимеры более высокого порядка мономерных антител. Антитело также включает моноспецифичные, биспецифичные или мультиспецифичные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена требуемой специфичности. Термин также включает антитело, которое связано или присоединено к фрагменту, не являющемуся антителом. Кроме того, термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным методом получения антитела. Например, он включает моноклональные антитела, рекомбинантные антитела и поликлональные антитела. Согласно настоящему изобретению предложено антитело, описанное в настоящем документе. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложена часть, производное и/или аналог антитела, раскрытого в настоящем документе. Часть, производное и/или аналог сохраняет антигенсвязывающее свойство антитела по существу, но необязательно по степени. Неограничивающие примеры части и/или производного включают часть антитела, которая представляет собой антигенсвязывающую часть и обычно содержит один или более переменных доменов антитела. Неограничивающие примеры представляют собой различные фрагменты Fab. Часть также может представлять собой так называемый однодоменный фрагмент антитела. Однодоменный фрагмент антитела (sdAb, названный нанотело (Nanobody) разработчиком Ablynx) представляет собой фрагмент антитела с одним мономерным переменным доменом антитела. Подобно целому антителу он способен селективно связываться с конкретным антигеном. Имея молекулярную массу всего 12-15 кДа, фрагменты однодоменных антител намного меньше, чем обычные антитела (150–160 кДа), состоящие из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем фрагменты Fab (~50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные переменные фрагменты (~25 кДа, две переменные области, одна из легкой и одна из тяжелой цепи). Однодоменные антитела сами по себе ненамного меньше нормальных антител (обычно 90-100 кДа). Фрагменты однодоменных антител в основном конструируют из антител с тяжелой цепью, обнаруженных у верблюдовых; они называются фрагментами VHH (нанотела (Nanobodies[®])). У некоторых рыб также есть антитела только с тяжелой цепью (IgNAR, «иммуноглобулиновый новый антигенный рецептор»), из которых можно получить фрагменты однодоменных антител, называемые фрагментами VNAR. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов из обычного иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши на мономеры. Несмотря на то, что большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на переменных доменах тяжелой цепи, также было показано,

что нанотела, полученные из легких цепей, специфично связываются с целевыми эпитопами. Неограничивающий пример части антитела содержит переменный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела или его эквивалент. Неограничивающие примеры таких частей представляют собой V_{HH}, человеческие однодоменные антитела (dAbs) и юнитела (Unibodies). Предпочтительные части или производные антитела имеют по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи и легкой цепи антитела, как описано в настоящем документе. Неограничивающие примеры производного или части представляют собой фрагмент F(ab) и одноцепочечный фрагмент Fv. Функциональная часть биспецифичного антитела содержит антигенсвязывающие части биспецифичного антитела или производное и/или аналог связывающих частей.

«Одноцепочечное антитело» (scFv) имеет единственную полипептидную цепь, содержащую домен VL, связанный с доменом VH, причем домен VL и домен VH спарены с образованием моновалентной молекулы. Одноцепочечное антитело можно получить в соответствии с методом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426 и Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). «Диатело» имеет две цепи, каждая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, соединенную с переменной областью легкой цепи на той же полипептидной цепи, соединенную коротким пептидным линкером, причем две области на одной цепи спариваются не друг с другом, а с комплементарными доменами на другой цепи с образованием биспецифичной молекулы. Методы получения диател известны в данной области техники (см., например, Holliger P. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, и Poljak R. J. et al., (1994) *Structure* 2:1121-1123). Доменные антитела (dAb) представляют собой небольшие функциональные связывающие единицы антител, соответствующие переменным областям тяжелой или легкой цепей антител. Доменные антитела хорошо экспрессируются в бактериальных клеточных системах, дрожжевых клеточных системах и клеточных системах млекопитающих. Дополнительные сведения о доменных антителах и методах их получения известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 6291158; 6582915; 6593081; WO04/003019 и WO03/002609). Нанотела получают из тяжелых цепей антитела. Нанотело обычно содержит один переменный домен и два константных домена (CH₂ и CH₃) и сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Нанотела могут быть приготовлены методами, известными в данной области техники (см., например, патент США № 6765087, патент США № 6838254, WO 06/079372). Юнитела имеют одну легкую цепь и одну тяжелую цепь антитела IgG4. Юнитела можно получить путем удаления

шарнирной области антител IgG4. Дополнительные сведения о юнителах и методах их приготовления можно найти в WO 2007/059782.

Перечень аналогов антител увеличивается с каждым годом. При наличии последовательности переменных доменов и имеющихся в настоящее время обширных
5 знаний о трехмерной структуре многих различных антител специалист в данной области техники может преобразовать антитело согласно настоящему изобретению в тот или иной аналог, часть или производное антитела.

В дополнение к связывающей молекуле молекулы согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать фрагмент для увеличения периода
10 полужизни молекулы *in vivo*, такой как, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), человеческий сывороточный альбумин, группы гликозилирования, жирные кислоты и декстран. Такие дополнительные фрагменты могут быть конъюгированы или иным образом объединены со связывающим фрагментом с использованием методов, хорошо известных в данной области техники.

Также предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие
15 переменный домен антитела, описанного в настоящем документе. CAR представляют собой сконструированные рецепторы, которые объединяют новый вид специфичности (обычно антигенсвязывающую часть антитела или его производного) с иммунной клеткой для нацеливания на клетки. Рецепторы называются химерными, потому что они слиты из
20 частей из разных источников (Т-лимфоциты, генетически модифицированные для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR); см., например, Eshhar, патент США № 7741465; Eshhar, публикация заявки на патент США № 2012/0093842). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны с активным соединением, например, токсином.
25 Кроме того, раскрытые антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть связаны с меткой, например, флуоресцентным белком, химической меткой, органическим красителем, окрашенной частицей или ферментом. Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны с лекарственным средством с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Согласно настоящему изобретению предложены
30 аналоги антител, части антител и производные антител, включая случаи, когда эти молекулы связаны с другими молекулами или встроены в них.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, раскрытое в настоящем документе, представляет собой химерное антитело. Термин «химерное антитело»
относится к антителу, которое содержит аминокислотные последовательности,
35 полученные от двух разных видов, таких как человек и мышь, обычно комбинацию

вариабельных областей мыши (из тяжелых и легких цепей) и константных областей человека (тяжелые и легкие цепи). Неограничивающий пример создания такого химерного антитела описан в рабочих примерах (Пример 6). В этом химерном антителе константная область IgG1/каппа мыши заменена константным доменом IgG/каппа человека.

5 Согласно предпочтительному варианту реализации антитело, раскрытое в настоящем документе, представляет собой гуманизованное антитело. Термин «гуманизованное антитело» относится к антителу, которое содержит некоторые или все CDR из антитела животного, отличного от человека, в то время как каркасная и константная области антитела содержат аминокислотные остатки, полученные из 10 последовательностей антитела человека. Гуманизованные антитела обычно получают путем прививки CDR из антитела мыши в последовательности каркаса человека с последующей обратной заменой определенных остатков каркаса человека соответствующими остатками мыши из исходного антитела. Гуманизованные антитела также могут быть созданы *in silico* с использованием аминокислотной последовательности антитела нечеловеческого происхождения и технологии Protein Design Lab (PDL) (патент США 569376, патент США 5693671, патент США 5585089). Преимуществом гуманизованных антител является их повышенная переносимость *in vivo* по сравнению с мышинными аналогами. 15

Термин «деиммунизованное антитело» также относится к антителу нечеловеческого происхождения, в котором, обычно в одной или более вариабельных областях, удален один или более эпитопов, которые имеют высокую склонность образовывать эпитоп Т-клеток и/или В-клеток человека, для снижения иммуногенности. Аминокислотная последовательность эпитопа может быть удалена полностью или частично. Однако обычно аминокислотную последовательность изменяют путем замены 25 одной или более аминокислот, составляющих эпитоп, одной или более другими аминокислотами, что изменяет аминокислотную последовательность на последовательность, которая не образует эпитоп Т-клетки и/или В-клетки человека. Аминокислоты заменяют аминокислотами, которые присутствуют в соответствующем положении(ях) в соответствующей вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной 30 области легкой цепи человека, в зависимости от обстоятельств.

Согласно предпочтительному варианту реализации антитело к CD89, раскрытое в настоящем документе, является гуманизованным.

В тех местах настоящего документа, где приведена ссылка на аминокислотную последовательность «с устраненным дезамидированием», подразумевается, что она 35 относится к аминокислотной последовательности, в которой аминокислота, склонная к

дезамидированию, заменена аминокислотой, которая менее склонна к дезамидированию или не склонна к нему. Дезамидирование представляет собой химическую реакцию, при которой амидная функциональная группа в боковой цепи аминокислот аспарагина или глутамина удаляется или превращается в другую функциональную группу. Обычно аспарагин (Asn) превращается в аспарагиновую кислоту или изоаспарагиновую кислоту. Глутамин (Gln) может быть превращен в глутаминовую кислоту или пироглутаминовую кислоту. Сайты Asn-Gly наиболее склонны к дезамидированию, и аспарагин легче дезамидируется по сравнению с глутамином. Дезамидирование аспарагина и/или глутамина может изменить структуру антитела, а также его стабильность и/или функцию.

5 В случае антитела эта реакция нежелательна, поскольку она может изменить структуру, стабильность или функцию антитела (например, связывание антитела с антигеном) и может привести к деградации антитела. Аминокислоты в переменных областях антител, которые склонны к дезамидированию, можно предсказать (Sydow et al. PLoS ONE 2014; 9(6): e100736). Таким образом, идентифицируются остатки, подверженные риску дезамидирования, и эти сайты затем могут быть устранены путем замены аминокислоты, склонной к дезамидированию, аминокислотой, менее склонной к дезамидированию.

10 15

Согласно предпочтительному варианту реализации гуманизованное антитело к CD89, раскрытое в настоящем документе, имеет устраненное дезамидирование. Согласно одному предпочтительному варианту реализации аспарагин, склонный к дезамидированию, заменяют аминокислотой серином (S), треонином (T) или глутамином (Q).

20

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, раскрытое в настоящем документе, представляет собой человеческое антитело. Термин «человеческое антитело» относится к антителу, состоящему только из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцировалось в организме мыши, в мышинной клетке или в гибридоме, полученной из мышинной клетки. Человеческие антитела могут быть приготовлены различными способами, известными в данной области техники. Химерные, гуманизованные, деиммунизированные и человеческие антитела включены в объем настоящего изобретения.

25 30

Антитело, которое может связывать CD89 человека, связывается с рецептором в условиях, которые обычно используются для связывания антител. Когда антитело и рецептор CD89 человека контактируют друг с другом в условиях, подходящих для связывания антитела, антитело будет связываться с рецептором CD89 человека. Антитело связывается с мембраносвязанным CD89 человека, экспрессированным на клетках

35

HEK293F, депонированных под номером DSM ACC3341, в то время как антитело не связывается в значительной степени с клетками HEK293F, которые не экспрессируют CD89 человека на своей клеточной мембране. Связывание антитела с клеткой, экспрессирующей CD89 человека, можно детектировать методами, известными 5 специалисту в данной области техники. Например, с использованием вторичного антитела, несущего флуоресцентную метку, и измерения меченых клеток с использованием проточной цитометрии (FACS).

CD89 представляет собой рецептор Fc, который может связывать IgA. Этот рецептор также известен как FcαRI. CD89 человека способен связываться с константной областью 10 тяжелой цепи IgA1 человека и IgA2 человека. CD89 представляет собой гликозилированный трансмембранный рецептор и имеет два внеклеточных домена, EC1 и EC2, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Взаимодействие CD89 с IgA опосредуется внеклеточным доменом EC1. В качестве референсной последовательности мы ссылаемся на NP_001991.1 (предшественник изоформы альфа-рецептора Fc 15 иммуноглобулина). Ссылка сделана исключительно для идентификации гена/белка CD89 человека. Она не предназначена для ограничения CD89 человека, описанного в настоящем документе, конкретной последовательностью записи в базе данных. Природные варианты CD89 человека, которые могут связывать IgA и могут быть связаны антителом, как описано в настоящем документе, включены в объем настоящего изобретения. 20 Рекомбинантный CD89 человека также включен в объем настоящего изобретения, если он может связывать IgA и может связывать антитело, описанное в настоящем документе

CD89 присутствует на клеточной поверхности клеток миелоидного происхождения, включая нейтрофилы, эозинофилы и большинство моноцитов и макрофагов. Рецептор не появляется на тучных клетках и кишечных макрофагах. Обнаружено, что экспрессия 25 CD89 является конститутивной и не зависит от присутствия лиганда IgA. Термин «клетки, экспрессирующие CD89 человека» относится к клетке, которая экспрессирует CD89 человека. Примерные клетки представляют собой нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и/или макрофаги.

Перекрестное связывание рецепторов CD89 на клетке может быть достигнуто путем 30 связывания антител IgA, иммунных комплексов IgA или антител к CD89. Связывание IgA может запускать иммунологический ответ, который может иметь положительные и отрицательные эффекты.

Термин «внеклеточный» буквально означает за пределами клеток. Термин «внеклеточная часть» относится к части молекулы, которая находится на внешней стороне 35 клеточной мембраны. Эта часть молекулы может быть доступна для взаимодействий с

другими молекулами за пределами клетки. Рецептор CD89 человека имеет 2 внеклеточных домена, а именно EC1 и EC2. Эти домены могут взаимодействовать с молекулами за пределами клетки, например, с антителами IgA. Известно, что IgA связывается с доменом EC1 рецептора CD89 человека.

5 Клетки, экспрессирующие CD89 человека, представляют собой клетки, которые экспрессируют молекулу CD89 человека. Предпочтительно молекула присутствует на клеточной мембране клетки. Примерами клеток, экспрессирующих CD89 человека, являются, но не ограничиваются ими, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и/или макрофаги. Кроме того, модифицированная клеточная линия HEK293F, экспрессирующая
10 CD89 человека на клеточной мембране, депонирована под номером: DSM ACC3341.

Термин «предотвращать связывание» относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытого в настоящем документе, предотвращать взаимодействие IgA с рецептором CD89 человека. Если антитело к CD89 или фрагмент указанного антитела связаны с рецептором CD89 человека, IgA больше не может
15 связываться с рецептором CD89 человека. Предпочтительно связывание антитела к CD89, раскрытого в настоящем документе, блокирует или снижает способность IgA связываться с рецептором CD89 человека по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.
Предотвращение или блокирование, или уменьшение связывания IgA с CD89
20 предпочтительно измеряют способом, описанным в примерах. Предпочтительно используют клетки, экспрессирующие CD89. Предпочтительно указанные клетки стабильно экспрессируют CD89 человека. Антитело, представляющее интерес, титруют на клетках, экспрессирующих CD89. Затем клетки инкубируют с IgA. После промывки связанный с клетками IgA детектировали с использованием меченого антитела против
25 IgA, предпочтительно флуоресцентномеченого антитела. Связывание IgA на мембране клеток, экспрессирующих CD89 человека, можно измерить с использованием проточного цитометра (FACS). Количество связанного IgA указывает на блокирующие способности титрованного антитела. Меньшее связывание IgA при определенной концентрации антитела указывает на более сильную блокирующую способность антитела.
30 Предпочтительный способ описан в примерах, результаты которых представлены на Фигуре 4а и Фигуре 4б. Тестируемое антитело предпочтительно титруют на лунках, покрытых CD89 человека, или на клетках HEK293F, экспрессирующих CD89. Блокирующую способность затем легко определяют путем сравнения кривой титрования с кривыми, полученными с использованием положительного контроля, такого как MIP8a.
35 Процентные значения блокирования обычно приведены в процентах по сравнению с

блокированием с помощью MIP8a при прочих равных условиях. Сравнение процента связывания тестируемого антитела и контрольного антитела MIP8a предпочтительно выполняют при концентрации антитела, при которой тестируемое антитело только что достигло по меньшей мере 90% своей блокирующей способности. На фигуре 4b эта концентрация антитела примерно 1 мкг/мл. В этом примере рассчитанный процент блокирования антитела 8F3 составляет примерно $((800-200)/800) \times 100 =$ примерно 75%. Рассчитанный процент блокирования антитела 16D6 составляет примерно $((800-450)/800) \times 100 =$ примерно 45%. Контрольный IgG1, который не связывает CD89, обычно не предотвращает связывание IgA с CD89.

Имуноглобулин А представляет собой изотип антител, который обнаруживается, помимо прочего, в крови и в выделениях серозно-слизистых оболочек. IgA человека имеет два подкласса, а именно IgA1 и IgA2, и может продуцироваться в мономерной и димерной форме. Димерная форма является наиболее распространенной формой. Секретируемая форма димерного IgA также называется секреторным IgA. Секретируемая форма IgA частично стерически затрудняется при ее связывании с FcαRI. Это связано с тем, что некоторые из FcαRI-связывающих сайтов sIgA закрыты участком расщепленного полимерного рецептора Ig (называемого секреторным компонентом после расщепления), который способствует секреции sIgA в просвет кишечника. Перед связыванием с полимерным рецептором димерный IgA (dIgA) связывается с FcαRI приблизительно с такой же аффинностью, что и мономерный IgA. Термин «термоагрегированный IgA» относится к комплексам IgA, образованным при нагревании IgA. Эти агрегаты могут имитировать иммунные комплексы, например, циркулирующие иммунные комплексы. Комплексы термоагрегированного IgA могут быть получены любым методом, известным специалисту в данной области техники.

Термин «гибель клеток» относится к событию, при котором биологическая клетка перестает выполнять свои функции. Гибель клеток может быть вызвана различными причинами, например, апоптозом, запрограммированной гибелью клеток, митотической катастрофой, ишемической гибелью клеток и/или иммуногенной гибелью клеток. Термин «жизнеспособность клетки» относится к способности клетки выполнять определенные функции, такие как метаболизм, рост, размножение, некоторая форма восприимчивости и приспособляемость. Гибель клеток и жизнеспособность клеток можно оценить с помощью ряда подходящих анализов, известных специалисту в данной области техники, например, мультиплексного анализа цитотоксичности MultiTox-Glo или MultiTox-Fluor (Promega, Мэдисон, Висконсин) или анализа живых и мертвых клеток (Abcam; Кембридж, Массачусетс). Методы на основе исключения красителя часто используются в качестве

меры для определения мертвых клеток. Красители, такие как трипановый синий, с трудом проникают через мембрану живых клеток, но будут проникать в мертвые клетки, поскольку они не способны поддерживать целостность своей клеточной мембраны. Подходящий метод определения жизнеспособности клеток описан в разделе примеров.

- 5 Антитела, которые специфично создают помехи для IgA-связывающего сайта на CD89, известны в данной области техники. Например, антитела MIP8a, 2D11 или MY43, описанные в Morton et al., J. Exp. Med. 1999 Jun 7;189(11):1715-22 и Shen L.A., J Leukoc Biol. 1992 Apr;51 (4):373-8. MIP8a представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое связывается с CD89 человека и имеет константную область IgG1 мыши.
- 10 Показано, что MIP8a индуцирует гибель нейтрофилов, как описано Wehrli et al., J Immunol. 2014 Dec 1;193(11):5649-59.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное антитело к CD89 человека, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGGLEX₁VX₂T
IX₃GX₄GDITYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY
DYDYAMDYWG QGTLVTVSS

в которой:

- 20 X₁ представляет собой L или W
X₂ представляет собой A или S
X₃ представляет собой N, S
X₄ представляет собой Q, T или N,
причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит предпочтительно 0-3,
25 предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений аминокислот по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от X₁, X₂, X₃ и X₄,
и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKZ₁Z₂KLLIYY
30 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD Z₃TLTISSLQP EDFATYZ₄CQQ GKTLPYTFGQ GTKLEIK

в которой:

- Z₁ представляет собой A или T
Z₂ представляет собой V или P
Z₃ представляет собой Y или F
35 Z₄ представляет собой Y или F,

причем указанная вариабельная область легкой цепи содержит предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений аминокислот по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄.

5 Согласно некоторым вариантам реализации X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, A, S и T, или L, A, S и Q, или L, A, N и N, или W, A, N и N, или W, S, N и N, и Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄ представляют собой A, V, Y и Y.

Согласно другим вариантам реализации X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, A, N и N, или W, A, N и N, или W, S, N и N, и Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄ представляют собой A, P, F и Y.

10 Согласно дополнительным вариантам реализации X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, A, N и N, или W, A, N и N, или W, S, N и N, и Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄ представляют собой A, P, Y и Y.

Согласно дополнительным вариантам реализации X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, A, N и N, или W, A, N и N, или W, S, N и N, и Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄ представляют собой
15 T, V, Y и F.

Согласно предпочтительному варианту реализации X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, A, S и T, и Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄ представляют собой A, V, Y и Y. Согласно другому предпочтительному варианту реализации X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой L, A, S и Q, и Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄ представляют собой A, V, Y и Y.

20 Согласно предпочтительному варианту реализации антитело к CD89 человека, раскрытое в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность
EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAT
IX₃GX₄GDITYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY
DYDYAMDYWG QGTLVTVSS

25 причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений аминокислот по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от X₃ и X₄,

и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность
30 SEQ ID NO: 122, содержащую 0, 1, 2 или 3 вставки, делеции, замены или добавления аминокислот.

Согласно предпочтительному варианту реализации X₃ представляет собой S и X₄ представляет собой T.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации X₃ представляет собой S
35 и X₄ представляет собой Q.

Тяжелая цепь, раскрытая в настоящем документе, содержит 10, предпочтительно 9, предпочтительно 8, предпочтительно 7, предпочтительно 6, предпочтительно 5, предпочтительно 4, предпочтительно 3, предпочтительно 2, предпочтительно 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Из указанных 0-10 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот в вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3. Вариабельная область тяжелой цепи, раскрытая в настоящем документе, содержит 3, предпочтительно 2, предпочтительно 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные 0-3 вставки, делеции, замены аминокислот присутствуют в положениях, отличных от X_1 , X_2 , X_3 и X_4 , и вставка, делеция, замена или добавление аминокислоты в вариабельной области тяжелой цепи, если присутствует, находится в каркасном участке. Вставка, делеция, замена или добавление аминокислоты в вариабельной области тяжелой цепи, если присутствует, предпочтительно не является вставкой, делецией, заменой или добавлением аминокислоты, выбранной из лейцина (L) в положении 5, аргинина (R) в положении 19, аланина (A) в положении 40, глицина (G) в положении 42, глицина (G) в положении 44, серина (S) в положении 75, аспарагина (N) в положении 84, аргинина (R) в положении 87, аланина (A) в положении 88, валина (V) в положении 93 и лейцина (L) в положении 114 вариабельной области тяжелой цепи.

Легкая цепь, раскрытая в настоящем документе, содержит 8, предпочтительно 7, предпочтительно 6, предпочтительно 5, предпочтительно 4, предпочтительно 3, предпочтительно 2, предпочтительно 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Из указанных 0-8 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот в константной области легкой цепи присутствуют не более 5 и в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3. Вариабельная область легкой цепи, раскрытая в настоящем документе, содержит 3, предпочтительно 2, предпочтительно 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные 0-3 вставки, делеции, замены или добавления аминокислот присутствуют в положениях, отличных от Z_1 , Z_2 , Z_3 и Z_4 , и вставка, делеция, замена или добавление аминокислоты в вариабельной области легкой цепи, если присутствует, находится в каркасном участке. Вставка, делеция, замена или добавление аминокислоты в вариабельной области легкой цепи, если присутствует, предпочтительно не является вставкой, делецией, заменой или добавлением аминокислоты, выбранной из пролина (P) в положении 8, валина (V) в положении 15, аргинина (R) в положении 18, треонина (T) в положении 22, глицина (G) в положении 41,

лизина (K) в положении 42, аспарагиновой кислоты (D) в положении 70, треонина (T) в положении 72, изолейцина (I) в положении 75, серина (S) в положении 77, глутамина (Q) в положении 79, глутамина (Q) в положении 80, треонина (T) в положении 83 и глутамина (Q) в положении 100 вариабельной области легкой цепи.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122 с 0, 1, 2 или 3 вставками,
10 делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в
15 вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями
20 аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID
25 NO: 136. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH3STVL3.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 139 с 0, 1, 2 или 3 вставками,
30 делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит
35 тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 143 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в
вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более
2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или
добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID
5 NO: 136 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями
аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3,
предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок,
делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное
гуманизованное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89
10 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:
143, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID
NO: 136. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело
10E7 VH3SQVL3.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное
15 антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи
с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119 с 0, 1, 2 или 3 вставками,
делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой
цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122 с 0, 1, 2 или 3 вставками,
делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено
20 гуманизованное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит
тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6,
7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в
вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более
25 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или
добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID
NO: 136 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями
аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3,
предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок,
30 делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное
гуманизованное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89
человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:
133, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID
NO: 136. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело
35 10E7 VH3VL3.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH3VL4.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO: 134 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное
5 гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH1VL1.

10 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой
15 цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в
20 вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями
25 аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:
30 NO: 135. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH1VL2.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117 с 0, 1, 2 или 3 вставками,
35 делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой

цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит
5 тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID
10 NO: 136 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизованное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89
15 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH1VL3.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное
20 антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено
25 гуманизованное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более
30 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок,
35 делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное

гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 131, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH1VL4.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH2VL1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит

тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH2VL2.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO: 136. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH2VL3.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

10 Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное
15 гуманизованное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH2VL4.

25 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.
30

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизованное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в переменной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более
35

2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, 5 предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 10E7 VH3VL1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119 с 0, 1, 2 или 3 вставками, 15 делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121 с 0, 1, 2 или 3 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело, связывающее CD89, причем указанное антитело содержит 20 тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, при этом в вариабельной области тяжелой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями 25 аминокислот, при этом в вариабельной области легкой цепи присутствуют не более 3, предпочтительно не более 2, предпочтительно не более 1, предпочтительно 0 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 135. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 30 10E7 VH3VL2.

Согласно одному аспекту гуманизированное антитело, раскрытое в настоящем документе, обладает более высокой аффинностью в отношении внеклеточной части CD89 35

человека по сравнению с химерным антителом, содержащим тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99.

5 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека (Fc α RI человека) на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое индуцирует меньшую клеточную гибель в клетках, экспрессирующих CD89 человека, по сравнению с антителом MIP8a. Предпочтительно антитело индуцирует на 10 10% меньшую гибель клеток по сравнению с антителом MIP8a. Более предпочтительно антитело индуцирует на 20% меньшую гибель клеток по сравнению с антителом MIP8a. Более предпочтительно антитело индуцирует на 40% меньшую гибель клеток по сравнению с антителом MIP8a. Свойство антитела индуцировать гибель клеток предпочтительно определяют с использованием клеток НЕК293F, экспрессирующих 15 CD89 человека, депонированных под номером: DSM ACC3341.

Эффекторные клетки-мишени могут быть лизированы после связывания антител к CD89 человека. Антитело, раскрытое в настоящем документе, можно применять для нацеливания на клетки, экспрессирующие CD89 человека, не запуская обширной клеточной гибели или лизиса клеток-мишеней. Такие характеристики можно применять 20 для поддержания клеток-мишеней живыми. Выжившие клетки могут отвечать на связывание антитела к CD89, возможно, путем измененной передачи сигналов. Выжившие клетки, экспрессирующие CD89, могут отвечать на отсутствие связывания IgA с CD89 из-за блокирующих свойств антитела, раскрытого в настоящем документе. Клетка, имеющая антитело, раскрытое в настоящем документе, может быть доступна для ответа на другие 25 раздражители, патогены и/или иммунные действия независимо от IgA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и не 30 снижает клеточную жизнеспособность указанных клеток более чем на 60% после инкубации в течение ночи при 37°C. Предпочтительно связывание антитела с указанными клетками не снижает клеточную жизнеспособность указанных клеток после инкубации в течение ночи более чем на 50% или более чем на 40%, или более чем на 30%, или более чем на 20%, или более чем на 10% или менее. Свойство антитела защищать 35 жизнеспособность клеток предпочтительно определяют с использованием клеток

HEK293F, экспрессирующих CD89 человека, депонированных под номером: DSM ACC3341.

Клетки обычно культивируют при 37°C. Влияние раздражителей на клетки может быть видимым сразу или после инкубационного периода. Некоторые раздражители требуют передачи клеточных сигналов, прежде чем эффект станет видимым. Термин «инкубация в течение ночи при 37°C» указывает, что клетки инкубируют с раздражителями в течение ночи. «В течение ночи» может означать, например, 12-16 часов или 8-24 часа, после чего измеряют характеристики клеток, например, жизнеспособность клеток или экспрессию фосфатидилсерина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток более чем на 20% после инкубации в течение ночи при 37°C. Предпочтительно связывание антитела с указанными клетками не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток после инкубации в течение ночи при 37°C более чем на 20%, более предпочтительно не более чем на 10%, более предпочтительно не более чем на 5%. Влияние антитела на экспрессию фосфатидилсерина предпочтительно определяют с использованием клеток HEK293F, экспрессирующих CD89 человека, депонированных под номером: DSM ACC3341.

Фосфатидилсерин представляет собой фосфолипид и является компонентом клеточной мембраны. Он играет роль в передаче клеточных сигналов и коррелирует с гибелью клеток и апоптозом. Экспрессию фосфатидилсерина в мембране клеток можно использовать в качестве маркера гибели клеток. Экспрессию фосфатидилсерина в мембране клеток можно измерить с помощью методов, известных специалисту в данной области техники. Фосфатидилсерин активно удерживается, будучи обращенным к цитозольной (внутренней) стороне клеточной мембраны. Однако когда клетка подвергается апоптозу, фосфатидилсерин больше не ограничивается цитозольной стороной. Вместо этого он быстро обменивается между двумя сторонами. Экспрессию фосфатидилсерина обычно определяют путем детектирования фосфатидилсерина на направленной наружу поверхности клеточной мембраны. Уровни фосфатидилсерина можно сравнить с контрольными клетками, например, необработанными клетками. Примерный способ подробно описан в разделе примеров.

Экспрессию фосфатидилсерина можно определить путем инкубации клеток с антителом к фосфатидилсерину. Одновременно с этим клетки можно инкубировать с отрицательным контролем, например, антителом к CD19 человека. После промывки и фиксации клеток мембранную экспрессию фосфатидилсерина можно измерить с использованием проточного цитометра (FACS).

Согласно некоторым вариантам реализации предложено антитело, которое: может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека; которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, при 37°C в отсутствие NaN₃; которое не может вытеснять мономерный IgA человека или термоагрегированный IgA, когда оно связано с указанными клетками, более чем на 90% при 4°C в присутствии NaN₃. Влияние антитела на вытеснение IgA предпочтительно определяют с использованием клеток НЕК293F, экспрессирующих CD89 человека, депонированных под номером: DSM ACC3341.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

Азид натрия в комбинации с низкой температурой 4°C применяют для ингибирования метаболической активности клеток. Азид натрия является обратимым ингибитором митохондриального дыхания. Ингибирование метаболической активности клеток относится к уменьшению митохондриального дыхания клетки. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, раскрытое в настоящем документе, не может вытеснять IgA человека более чем на 90% на клетках с ингибированным метаболизмом.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается на 20% или менее с рекомбинантной молекулой CD89 человека, в которой аминокислоты 22-46 CD89 человека заменены аминокислотами 22-46 CD89 яванской макаки, в то время как указанное антитело может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками. Предпочтительно антитело связывается на 10% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой антитело 20B4. Аминокислоты Gln22-Lys46, замененные в этой молекуле CD89, являются частью домена EC1 CD89 (SEQ ID NO: 23). Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного антитела с указанной клеткой индуцирует меньшую гибель клеток в клетках, экспрессирующих CD89 человека, по сравнению с MIP8a. Согласно некоторым вариантам реализации

связывание указанного антитела с указанной клеткой не снижает жизнеспособность указанных клеток более чем на 60% после инкубации в течение ночи при 37°C. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного антитела с указанной клеткой не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток более чем на 20% после
5 инкубации в течение ночи при 37°C.

Система IgA различается у разных видов, включая человека, мышь и кролика. Например, не идентифицирован мышинный гомолог гена CD89 человека. Гомологи CD89 были идентифицированы у крыс и крупного рогатого скота. Настоящее раскрытие включает рабочие примеры антител, связывающихся с CD89 на клетках человека,
10 экспрессирующих CD89 человека, и клетках человека, экспрессирующих химерные молекулы CD89. Химерная молекула CD89 человека/яванской макаки имеет часть молекулы CD89 человека и часть CD89 яванской макаки. Части объединены таким образом, что общая структура белка остается неизменной.

Ген CD89 яванской макаки (*Macaca fascicularis*) имеет интронную/экзонную
15 структуру, сходную с таковой CD89 человека, и проявляет 86% гомологии с геном человека (Rogers et al. 2004, Immunology). Замены аминокислот CD89 человека соответствующими аминокислотами CD89 яванской макаки можно использовать для тестирования специфичности и перекрестной реактивности антител. Замены с использованием CD89 яванской макаки могут способствовать идентификации эпитопа
20 антитела к CD89 человека.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается на 20% или менее с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 47-71 CD89 человека заменены аминокислотами 47-71 CD89 яванской макаки, при этом указанное антитело может связывать внеклеточную часть CD89
25 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками. Предпочтительно антитело связывается на 10% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека. Предпочтительно антитело связывается на 5% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека.
30 Примерные антитела с такими характеристиками представляют собой антитела 20B4, 8F3, 30C7 и 16D6. Аминокислоты Ile47-Ile71 являются частью домена EC1 CD89 (SEQ ID NO: 24). IgA может связываться с этой частью рецептора CD89. Таким образом, антитела, которые связываются с этой частью рецептора CD89, потенциально препятствуют взаимодействию IgA с CD89.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается на 20% или менее с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 72-96 CD89 человека заменены аминокислотами 72-96 CD89 яванской макаки, при этом указанное антитело может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками. Предпочтительно антитело связывается на 10% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека. Предпочтительно антитело связывается на 5% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека. Примерные антитела с такими характеристиками представляют собой антитела 8F3, 10E7 и 16D6. Аминокислоты Gly72-Gly96 являются частью домена EC1 CD89 (SEQ ID NO: 25). Считается, что эта часть домена EC1 содержит петлю F-G, которая, как прогнозируется, расположена в нижней части EC1 в положении, близком к клеточной мембране.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, связывание которого не снижается на 20% или менее с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 97-121 CD89 человека заменены аминокислотами 97-121 CD89 яванской макаки, и указанное антитело может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками. Предпочтительно связывание антитела с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека не снижается на 10% или менее. Примерные антитела с такими характеристиками представляют собой антитела 20B4, 8F3, 30C7, 10E7 и 16D6. Аминокислоты Arg97-Gly121 являются частью домена EC1 CD89 (SEQ ID NO: 26). Например, антитело MIP8a может связываться с этой частью домена EC1.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается на 20% или менее с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 58; 59; 73; 74; 76; 106 и 107 CD89 человека заменены аминокислотами 58; 59; 73; 74; 76; 106 и 107, соответственно, CD89 яванской макаки, при этом указанное антитело может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками. Предпочтительно антитело связывается на 10% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека. Предпочтительно антитело связывается на 5% или менее с указанной рекомбинантной молекулой CD89 человека. Примерные антитела с такими

характеристиками представляют собой Антитело 8F3, 10E7 и 16D6. Считается, что аминокислоты Thr58 и Gln59 имеют отношение к связыванию человеческих IgA и CD89.

Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного антитела с указанной клеткой действительно индуцирует меньшую гибель клеток в клетках, экспрессирующих CD89 человека, по сравнению с MIP8a. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного антитела с указанной клеткой не снижает клеточную жизнеспособность указанных клеток более чем на 60% после инкубации в течение ночи при 37°C. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного антитела с указанной клеткой не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток более чем на 20% после инкубации в течение ночи при 37°C.

Антитело, описанное в настоящем документе, может связываться с внеклеточной частью CD89 человека на клетках HEK293F, экспрессирующих CD89 человека. Примерные клетки HEK293F, которые экспрессируют мембраносвязанный CD89 человека, депонированы под номером: DSM ACC3341 в соответствии с Будапештским договором. Эти клетки HEK293F стабильно экспрессируют CD89 человека на своей клеточной поверхности. Предпочтительно использование этих клеток позволяет сравнить влияние различных антител, нацеленных на CD89 человека. Предпочтительно, чтобы исследовать процент клеток, подвергающихся клеточной гибели после связывания антитела к CD89. Использование клеточной линии, стабильно экспрессирующей CD89 человека, обычно уменьшает разницу в экспрессии между клетками и позволяет лучше сравнивать экспериментальные условия в сравнении с временно трансфицированными клетками.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 29-31 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 32-34 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 29-31, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 32-34.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10

вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, 5 замен или добавлений аминокислот расположены в каркасных участках вариабельной области легкой и/или тяжелой цепи. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28. Примерное антитело с 10 такими характеристиками представляет собой Антитело 8F3. Антитело, имеющее эти CDR, может связываться с эпитопом в домене EC1 CD89, в частности, с частью последовательностей SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с 15 последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 45-47 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 48-50 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, 20 содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 45-47, и вариабельную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 48-50.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с 25 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, 30 замен или добавлений аминокислот расположены в каркасных участках вариабельной области легкой и/или тяжелой цепи. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44. Примерное антитело с 35 такими характеристиками представляет собой Антитело 10E7. Антитело, имеющее эти

CDR, может связываться с эпитопом в домене EC1 CD89, в частности, с частью последовательности SEQ ID NO: 25.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 69-71 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 72-74 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 69-71, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 72-74.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, замен или добавлений аминокислот расположены в каркасных участках переменной области легкой и/или тяжелой цепи. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой Антитело 20B4. Антитело, имеющее эти CDR, может связываться с эпитопом в домене EC1 CD89, в частности, с частью последовательностей SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 77-79 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 80-82 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и

CDR3, имеющей SEQ ID NO: 77-79, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 80-82.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, 10 замен или добавлений аминокислот расположены в каркасных участках переменной области легкой и/или тяжелой цепи. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76. Примерное антитело с 15 такими характеристиками представляет собой Антитело 30C7. Антитело, имеющее эти CDR, может связываться с эпитопом в домене EC1 CD89, в частности, с частью последовательности SEQ ID NO: 24.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 53-55 с 0, 1 или 2 20 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 56-58 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Предпочтительно антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, 25 содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 53-55, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 56-58.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 30 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций, 35 замен или добавлений аминокислот расположены в каркасных участках переменной

области легкой и/или тяжелой цепи. Предпочтительно антитело, которое может связывать
внеклеточную часть CD89 человека, содержит переменную область тяжелой цепи с
аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51, и переменную область легкой
цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52. Примерное антитело с
5 такими характеристиками представляет собой Антитело 16D6. Антитело, имеющее эти
CDR, может связываться с эпитопом в домене EC1 CD89, в частности, с частью
последовательностей SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

Связывание антитела, упомянутого в настоящем документе в виде
последовательности, с клеткой может индуцировать меньшую гибель клеток в клетках,
10 экспрессирующих CD89 человека, по сравнению с MIP8a. Согласно некоторым вариантам
реализации связывание указанного антитела с указанной клеткой не снижает клеточную
жизнеспособность указанных клеток более чем на 60% после инкубации в течение ночи
при 37°C. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного антитела с
указанной клеткой не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток более
15 чем на 20% после инкубации в течение ночи при 37°C.

Также предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее
переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3,
имеющей SEQ ID NO: 37-39 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или
добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью
20 CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 40-42 с 0, 1 или 2 вставками, делециями,
заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно предпочтительному варианту реализации предложено антитело,
связывающее CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с
аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10
25 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область
легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,
8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно
предпочтительному варианту реализации вставки, делеции, замены или добавления
аминокислот расположены в каркасных участках переменной области легкой и/или
30 тяжелой цепи. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой
Антитело 9H7.

Согласно одному варианту реализации предложено антитело, связывающее CD89
человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1,
CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 61-63 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами
35 или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с

последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 64-66 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Согласно предпочтительному варианту реализации предложено антитело, связывающее CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 60 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации вставки, делеции, замены или добавления аминокислот расположены в каркасных участках вариабельной области легкой и/или тяжелой цепи. Примерное антитело с такими характеристиками представляет собой Антитело 26D6.

Антитело к CD89 человека или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему раскрытию предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, описанные в настоящем документе. Такое антитело имеет хорошие характеристики. Безусловно, можно создать варианты такого исходного антитела путем модификации одной или более аминокислот в нем. Многие из таких вариантов будут вести себя более или менее подобным образом по сравнению с указанным оригиналом. Такие варианты также включены в объем настоящего изобретения.

Варианты могут иметь замены, вставки, делеции или добавления аминокислот по отношению к последовательности исходного антитела. Замена аминокислоты представляет собой замену одной аминокислоты другой аминокислотой. Предпочтительно аминокислоту заменяют аминокислотой, имеющей сходные химические свойства, что часто называют консервативной заменой. Делеции аминокислот приводят к делеции одной или более аминокислот из последовательности. Вставки аминокислот приводят к появлению в последовательности одной или более дополнительных аминокислот. Добавление аминокислоты приводит к тому, что одна или более аминокислот появляются в начале или в конце аминокислотной последовательности.

Неограничивающим примером такой модификации является антитело, содержащее пироглутамат вместо глутамата. Другими неограничивающими примерами таких модификаций являются вставка, делеция, инверсия и/или замена одной или более аминокислот по сравнению с указанным исходным антителом. Предпочтительно замены, вставки, делеции или добавления аминокислот находятся за пределами CDR вариабельного домена. Предпочтительно замены, вставки, делеции или добавления

аминокислот находятся в пределах каркасных участков вариабельной области и/или в константной области антитела. Связывание вариантов с CD89 можно протестировать, как описано в настоящем документе.

5 Согласно некоторым вариантам реализации константная область антитела согласно настоящему изобретению представляет собой константную область антитела IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, такого как антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Константные области могут содержать модификации, такие как замены аминокислот, для придания конкретных свойств константным областям. Например, мутация шарнирной области IgG4 для придания антителу большей стабильности по отношению к обмену половинами молекул.
10 Другие модификации влияют на время полужизни антитела, добавляют или удаляют сайт гликозилирования, улучшают продукцию, улучшают гомогенность продукта антитела, продуцируемого в ферментерах большого масштаба, и т. д.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой IgG1 мыши, IgG1 человека, мутированный в константной области для снижения или
15 предотвращения активации комплемента или взаимодействий с рецептором Fc, или IgG4 человека, или IgG4 человека, мутированный для предотвращения обмена половинами молекул с другими молекулами IgG4. Согласно предпочтительному варианту реализации антитело, раскрытое в настоящем документе, представляет собой гуманизированный IgG4 или гуманизированный IgG4, мутированный для предотвращения обмена половинами
20 молекул с другими молекулами IgG4, или гуманизированный IgG1, мутированный в константной области для снижения или предотвращения активации комплемента или взаимодействий с рецептором Fc.

Допускаются некоторые вариации в константной области антитела, раскрытого в настоящем документе. Обычно в константной области допускается примерно 0-10 замен
25 аминокислот. Часто допускается более 10 изменений аминокислот. Антитело согласно настоящему изобретению может иметь константную область тяжелой цепи (СН1-СН2-СН3) с 0-15, предпочтительно 0-10, более предпочтительно 0-5, более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1 или 0 замен аминокислот по отношению к встречающейся в природе константной области тяжелой цепи (СН1-СН2-СН3). Такое антитело может иметь константную область
30 легкой цепи с 0-5, предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1 или 0 замен аминокислот по отношению к встречающейся в природе константной области легкой цепи.

Некоторые вариации в IgG4 встречаются в природе и/или допускаются без изменения иммунологических свойств полученного антитела. Антитело с константной областью IgG4 или мутированной константной областью IgG1 обладает по меньшей мере
35 большинством фармакологических свойств антитела, но не связывает комплемент и,

таким образом, не будет индуцировать истощения клеток, с которыми оно связывается *in vivo*. Предпочтительно указанная константная область представляет собой константную область антитела человека (химерную).

Предпочтительно указанная константная область представляет собой область, дефектную по активации комплемента, предпочтительно константную область IgG₄ человека или мутированную константную область IgG₁ человека. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное гуманизованное антитело, раскрытое в настоящем документе, имеет изотип IgG₄ или IgG₁.

Связывание CD89 антителом и его антигенсвязывающими фрагментами, раскрытыми в настоящем документе, можно подтвердить в ряде подходящих анализов, известных специалисту в данной области техники. Такие анализы включают, например, анализы аффинности, например, Вестерн-блоты, радиоиммуноанализ, FACS и ИФА (иммуноферментный анализ). В примерах (например, Примере 2 (а)) подробно описаны некоторые из многих анализов, которые можно использовать для измерения связывания CD89, а также способ определения относительной аффинности связывания антитела в отношении CD89 человека.

Термин «связывающая молекула» включает (1) антитело, (2) антигенсвязывающий фрагмент антитела и (3) производное антитела, каждое из которых определено в настоящем документе. Термин «связывается с CD89» или «может связываться (с) CD89» или «связывание с CD89» относится к связыванию связывающей молекулы, как определено в настоящем документе, с рецептором CD89 человека в анализе *in vitro*, таком как BIAcore™ (поверхностный плазмонный резонанс) или Octet® (интерферометрия биослоя). Связывающая молекула имеет аффинность связывания (K_D) примерно 1×10^{-6} М или менее, примерно 1×10^{-7} М или менее, примерно 1×10^{-8} М или менее, примерно 1×10^{-9} М или менее, примерно 1×10^{-10} М или менее, примерно 1×10^{-11} М или менее или примерно 1×10^{-12} М или менее. Указанное связывание предпочтительно является специфичным, это означает, что CD89 или его эпитоп специфично связывается связывающей молекулой. Аффинность представляет собой меру силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Специфичное связывание или «специфичное распознавание» определяется в настоящем документе как связывание со значениями аффинности (K_D) не более 1×10^{-6} М, предпочтительно не более 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М или наиболее предпочтительно не более 1×10^{-9} М.

Как описано в настоящем документе ниже, K_D гуманизованного антитела к CD89 человека, описанного в настоящем документе, предпочтительно составляет менее 1,5 нМ, например, менее 1,4 нМ, менее 1,3 нМ, менее 1,2 нМ, менее 1,1 нМ или менее 1 нМ. Это

значение K_D неожиданно меньше по сравнению с K_D исходного мышинового антитела, которая составляет примерно 1,7 нМ.

Термин « K_D » относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном и используется для описания аффинности связывания между лигандом (таким как антитело) и белком (таким как CD89). Чем меньше равновесная константа диссоциации, тем прочнее связан лиганд или тем выше аффинность между лигандом и белком. K_D можно измерить с помощью анализов на основе поверхностного плазмонного резонанса и интерферометрии биослоя. Термин «антитело к CD89» относится к антителу, определенному в настоящем документе, способному связываться с CD89, предпочтительно с CD89 человека.

Термины « K_{on} » и « K_{off} » относятся к константам скорости ассоциации (скорость прямой реакции) лиганда (такого как антитело) с его белком-мишенью (например, CD89) и диссоциации (скорость обратной реакции) с указанным белком, соответственно. « K_{on} » характеризует то, как быстро лиганд (такой как антитело) связывается со своим белком-мишенью (например, CD89), и « K_{off} » характеризует то, как быстро лиганд (такой как антитело) диссоциирует от своего белка-мишени (например, CD89).

Способность блокировать взаимодействие IgA с рецептором CD89 антитела и его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытого в настоящем документе, может быть подтверждена в ряде подходящих анализов, известных специалисту в данной области техники. Такие анализы включают, например, анализы аффинности ИФА и FACS. В представленных примерах (например, Пример 2 (b)) подробно описаны два из многих анализов, FACS и ИФА, которые можно использовать для тестирования способности антител к CD89 блокировать связывание IgA с рецептором CD89.

Для тестирования характеристик блокирования IgA антитела с помощью анализа ИФА планшеты покрывают рекомбинантным CD89. Затем покрытый планшет блокируют с использованием блокирующего буфера для предотвращения неспецифического связывания. Планшеты с рекомбинантным CD89 инкубируют с представляющим интерес антителом и/или супернатантом гибридомы. Затем в лунки с CD89 добавляют IgA. После промывки количество связанного IgA измеряют с помощью методик ИФА. Количество связанного IgA указывает на блокирующие способности тестируемого антитела, при этом меньшее связывание IgA указывает на более сильную блокирующую способность антитела. Кроме того, клетки, экспрессирующие CD89, можно использовать для тестирования характеристик блокирования IgA антитела с помощью FACS-анализа. Предпочтительно указанные клетки стабильно экспрессируют CD89 человека. Клетки, экспрессирующие CD89, инкубируют с представляющим интерес антителом или

представляющим интерес супернатантом гибридомы. Затем клетки инкубируют с IgA. После промывки IgA, связанный с клетками, метили с использованием вторичного антитела против IgA, предпочтительно флуоресцентного вторичного антитела. Связывание IgA на мембране клеток, экспрессирующих CD89 человека, можно измерить с использованием проточного цитометра (FACS). Количество связанного IgA указывает на блокирующие способности тестируемого антитела, при этом меньшее связывание IgA указывает на более сильную блокирующую способность антитела.

Чтобы проанализировать, способны ли очищенные антитела к CD89 человека, раскрытые в настоящем документе, вытеснять ранее насыщенный IgA на CD89 человека, специалист в данной области техники может использовать ряд известных подходящих анализов. Один из подходящих методов тестирования раскрыт в разделе примеров. В этом анализе IgA позволяют связаться с клетками, экспрессирующими CD89. После этого к клеткам добавляют антитело к CD89. Количество IgA, все еще связанного на клетке, можно измерить с помощью FACS-анализа. Анализ подробно описан в Примере 2. Этот и другие анализы можно использовать для измерения вытеснения IgA человека антителами к CD89 человека. Вытеснение можно измерить, используя метаболически активные клетки (например, инкубированные в течение ночи при 37°C) или используя метаболически неактивные клетки (например, инкубированные при 4°C в присутствии азида натрия).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, раскрытое в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в настоящем документе. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область, раскрытую в настоящем документе. Нуклеиновая кислота, используемая в настоящем изобретении, обычно, но не исключительно, представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК) или дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). На основании генетического кода специалист в данной области техники может определить последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариант антитела, раскрытый в настоящем документе. На основании вырожденности генетического кода шестьдесят четыре кодона могут быть использованы для кодирования двадцати аминокислот и сигнала терминации трансляции. Как известно специалисту в данной области техники, предпочтительное использование кодонов в разных организмах может влиять на уровень экспрессии генов. Специалисту доступны различные вычислительные инструменты для оптимизации использования кодонов в зависимости от того, в каких организмах будет экспрессироваться целевая нуклеиновая кислота.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий молекулу последовательности нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе. Термин «вектор» в контексте настоящего документа относится к молекуле нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид, бактериофаг или вирус животных, способной вводить гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает экспрессию или продукцию антитела согласно настоящему изобретению, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в клетке-хозяине. Вектор, используемый в соответствии с настоящим изобретением, например, получен из вируса животного, примеры которого включают, но не ограничиваясь перечисленными, вирус осповакцины (включая аттенуированные производные, такие как модифицированный вирус осповакцины Анкара, MVA), вирус болезни Ньюкасла (NDV), аденовирус или ретровирус. Вектор в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит экспрессионную кассету, содержащую промотор, подходящий для инициации транскрипции антитела в соответствии с настоящим изобретением в выбранных клетках-хозяевах. Примеры промоторов, подходящих для экспрессии полипептидов в соответствии с настоящим изобретением в эукариотических клетках-хозяевах, включают, но не ограничиваются ими, промотор бета-актина, промотор иммуноглобина, промотор 5S РНК или промоторы вирусного происхождения, такие как промоторы цитомегаловируса (ЦМВ), вируса саркомы Рауса (RSV) и обезьяньего вируса 40 (SV40) для хозяев-млекопитающих.

Если молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, экспрессируется(ются) в клетке, клетка может продуцировать антитело в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, согласно одному варианту реализации предложена клетка, содержащая антитело, молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением. Клетки-хозяева могут представлять собой клетки млекопитающих, насекомых, растений, бактерий или дрожжей. Указанная клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, предпочтительно клетку млекопитающего, наиболее предпочтительно клетку человека. Примеры клеточных линий млекопитающих, подходящих в качестве клеток-хозяев, включают клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NSO или клетку PER-C6TM. Для целей настоящего изобретения подходящей клеткой является любая клетка, способная содержать и предпочтительно продуцировать указанные антитела и/или указанные нуклеиновые

кислоты. В настоящее изобретение дополнительно включены клеточные культуры, которые содержат указанные клетки.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был введен вектор экспрессии, экспрессирующий антитело к CD89 человека, описанное в настоящем документе. Термин охватывает не только конкретную рассматриваемую клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях либо из-за влияния окружающей среды, либо из-за мутации, такое потомство может не быть идентичным родительской клетке, но все еще включено в объем термина «клетка-хозяин».

Антитело, раскрытое в настоящем документе, может быть получено любым способом, известным специалисту в данной области техники. Согласно предпочтительному варианту реализации антитела получают с использованием клетки, причем предпочтительно указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку СНО, клетку NS0 или клетку PER-C6TM. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой клетку СНО, предпочтительно указанная клетка культивируется в бессывороточной среде. Это включает сбор указанного антитела из указанной культуры. Антитело предпочтительно очищено из среды, предпочтительно указанное антитело прошло аффинную очистку. В качестве альтернативы, указанные антитела могут быть созданы синтетическим путем.

Различные учреждения и компании разработали клеточные линии для крупномасштабного получения антител, например, для клинического применения. Эти клетки также используются для других целей, таких как получение белков. Клеточные линии, разработанные для получения белков и антител в промышленных масштабах, далее называются в настоящем документе промышленными линиями клеток. Таким образом, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено применение клеточной линии, разработанной для крупномасштабного получения указанных антител.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением проявляет ряд видов активности, которые можно успешно применять в терапевтических и нетерапевтических целях. В частности, антитела в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения индивидуума. Предпочтительно антитела в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения заболеваний, связанных с иммунитетом, или для предотвращения заболеваний, связанных с иммунитетом. Согласно некоторым вариантам реализации антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно применяют в терапии, предпочтительно в терапии человека. Согласно

некоторым вариантам реализации антитела, раскрытое в настоящем документе, можно применять в исследовательских целях. Например, в экспериментах *in vitro*, культуре клеток, органотипической культуре и моделях *in vivo*.

5 Также описаны способы лечения или профилактики хронических воспалительных заболеваний (ХВЗ). Примерами ХВЗ являются, например, воспалительное заболевание кишечника (IBD), такое как язвенный колит или болезнь Крона, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, аллергический и неаллергический ринит, пищевые аллергии, такие как целиакия, и кожные заболевания, такие как линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз или герпетиформный дерматит. Одним из общих
10 признаков, способствующих разрушению тканей, наблюдаемых при ХВЗ, является локальное накопление полиморфноядерных клеток, более конкретно нейтрофилов и/или эозинофилов. Полиморфноядерные клетки представляют собой лейкоциты, характеризующиеся наличием гранул в их цитоплазме.

Связывание IgA с его рецептором CD89 может запускать каскад событий, включая
15 активацию иммунных клеток, что в конечном итоге приводит к миграции, накоплению и инфильтрации полиморфноядерных клеток. Поскольку перекрестное связывание CD89 IgA-иммунными комплексами сильно привлекает и активирует нейтрофилы, присутствие аберрантного IgA может привести к усугублению провоспалительных ответов, что ведет к повреждению тканей. Это может играть роль в различных ХВЗ, которые характеризуются
20 повышением уровней сывороточного (ауто-) IgA, например, при нефропатии IgA, пурпуре Шенлейна-Геноха, анкилозирующем спондилите, синдроме Шегрена, алкогольном циррозе печени, целиакии, астме, ВЗК, ревматоидном артрите, линейном IgA-зависимом буллезном дерматозе и герпетиформном дерматите (Aleyd et al. Immunol Rev 2015; 268: 123-138). Нарушение связывания между IgA и его рецептором CD89 может ингибировать
25 сигнальный каскад и накопление полиморфноядерных клеток. Таким образом, ХВЗ можно лечить или предотвращать с помощью введения эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении. Блокирование взаимодействия между IgA и рецептором на полиморфноядерных клетках, таких как нейтрофилы, может остановить воспалительную реакцию. Таким образом,
30 пациент с ХВЗ может получить пользу от лечения с использованием антитела, описанного в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения субъекта, страдающего воспалительными заболеваниями, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, раскрытого в настоящем
35 документе. Также предложен способ приготовления лекарственного средства для лечения

субъекта, страдающего воспалительными заболеваниями. В настоящем раскрытии описаны способы предотвращения активации иммунных клеток путем блокирования связывания между IgA и CD89.

Настоящее раскрытие дополнительно включает фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в настоящем документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую его, или клетку, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в настоящем документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую его. Предложены фармацевтические композиции, содержащие полипептид в соответствии с настоящим изобретением или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Такие композиции особенно подходят для применения в качестве лекарственного средства. Композиции могут быть в любых подходящих формах, таких как жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы. Дозировка и схема приема состава, которые выбирают, могут быть определены с помощью стандартных процедур, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие процедуры включают экстраполяцию и оценку схемы дозирования, полученной в моделях на животных, а затем определение оптимальной дозировки в клиническом исследовании диапазона доз с участием людей. Дозировка в фармацевтических композициях будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, таких как желаемое высвобождение и фармакодинамические характеристики.

В настоящем документе термин «субъект» представляет собой человека или животное. Субъекты включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, таких как люди, свиньи, хорьки, тюлени, кролики, кошки, собаки, коровы и лошади, и птиц, таких как куры, утки, гуси и индейки. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения субъект представляет собой млекопитающее. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации субъект представляет собой человека.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одной или более частям полноразмерного антитела, которые сохраняют способность связываться с тем же антигеном (например, CD89 человека), с которым связывается антитело. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» также включает часть антитела, которая является частью более крупной молекулы, образованной нековалентной или ковалентной ассоциацией, или частью антитела с одним или более дополнительными молекулярными объектами. Примеры дополнительных молекулярных объектов включают аминокислоты, пептиды или белки, такие как коровая область стрептавидина, которые можно использовать для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. Hum Antibodies

Hybridomas 1995; 6(3): 93-101). Примерный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой VH и/или VL антитела. Антигенсвязывающие фрагменты включают Fab, F(ab'), F(ab')₂, фрагменты области, определяющей комплементарность (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела и другие фрагменты иммуноглобулина, распознающие антиген. В некоторых случаях может подразумеваться, что термин «антитело» в контексте настоящего документа включает его антигенсвязывающий фрагмент.

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, состоящему только из аминокислотных последовательностей человеческих последовательностей иммуноглобулинов. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцировалось в организме мыши, в мышинной клетке или в гибридоме, полученной из мышинной клетки. Человеческие антитела могут быть приготовлены различными способами, известными в данной области техники.

Термин «эпитоп» относится к части антигена, которая способна специфично связываться с антителом или Т-клеточным рецептором или иным образом взаимодействовать с молекулой. «Эпитоп» также упоминается в данной области техники как «антигенная детерминанта». Эпитоп обычно состоит из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или углеводов, или сахаров. Эпитоп может быть «линейным» или «нелинейным/конформационным». После определения целевого эпитопа (например, путем картирования эпитопа) можно создать антитела к этому эпитопу. Создание и характеристика антител также может предоставить информацию о целевых эпитопах. На основе этой информации затем можно провести скрининг антител для выявления тех, которые связываются с одним и тем же эпитопом, например, путем проведения исследований перекрестной конкуренции для обнаружения антител, которые конкурируют между собой за связывание, т. е. антитела конкурируют за связывание с антигеном.

В настоящем документе термин «содержать» и его сочетания используется в его неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, не упомянутые конкретно, не исключены. Кроме того, глагол «состоять» может быть заменен «состоять по существу из», это означает, что соединение или вспомогательное соединение, как определено в настоящем документе, может содержать дополнительный компонент (компоненты), помимо конкретно указанного, причем указанный дополнительный компонент (компоненты) не изменяет уникальную характеристику настоящего изобретения.

Артикли (соотв., «a» и «an» в исходном тексте на английском языке) используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (то есть, по меньшей мере одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

5 Слово «приблизительно» или «примерно» при использовании в связи с числовым значением (приблизительно 10, примерно 10) предпочтительно означает, что значение может представлять собой заданное значение 10, которое больше или меньше на 1% от указанного значения.

10 В настоящем документе термины «лечение», «лечить» и «осуществлять лечение» относятся к обращению вспять, облегчению, отсрочке начала или ингибированию прогрессирования заболевания или нарушения или одного или более его симптомов, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации лечение можно проводить после развития одного или более симптомов. Согласно другим вариантам реализации лечение можно проводить в отсутствие симптомов. Например, 15 лечение можно проводить у восприимчивого индивидуума до появления симптомов (например, в свете наличия симптомов в анамнезе и/или в свете генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также можно продолжать после разрешения симптомов, например, чтобы предотвратить или отсрочить их рецидив.

20 В целях ясности и краткости описания признаки описываются в настоящем документе как часть одного и того же или отдельных вариантов реализации. Однако следует понимать, что объем настоящего изобретения может включать варианты реализации, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

Все ссылки на патенты и литературу, цитируемые в настоящем описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

25 Настоящее изобретение дополнительно поясняется следующими примерами. Эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения, а служат только для пояснения настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

30 **Пример 1. Создание блокирующих CD89/IgA мышинных моноклональных антител к CD89 человека**

(a). Создание клеток НЕК293F, временно экспрессирующих поверхностный CD89 человека, для иммунизации

кДНК, кодирующую полноразмерный белок CD89 человека (Swiss-Prot № P24071.1; см. SEQ ID NO: 1) оптимизировали для экспрессии у млекопитающих и 35 синтезировали в компании GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO: 2). Эту

кДНК субклонировали в экспрессионную плазмиду, полученную из pcDNA3.1. Эту плазмиду, несущую полноразмерный CD89 человека, временно трансфицировали в клетки FreeStyle™ 293F (Life Technologies) с использованием экспрессионной системы FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Через 2 дня эти клетки HEK293F собирали, промывали 5 стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и делили на аликвоты при $\approx 20,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в ФСБ и хранили при -80°C для получения клеточных лизатов. Перед хранением поверхностную экспрессию CD89 человека на трансфицированных клетках HEK293F подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием 10 разведенного 1:20 конъюгированного с фикоэритрином (ФЭ) мышинового антитела к CD89 человека (клон MIP8a; BioRad).

(b). Создание клеток HEK293F, стабильно экспрессирующих поверхностный CD89 человека, для скрининга

кДНК, кодирующую полноразмерный белок CD89 человека (Swiss-Prot № P24071.1; см. SEQ ID NO: 1) оптимизировали для экспрессии у млекопитающих и 15 синтезировали в компании GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO: 2). Эту кДНК субклонировали в экспрессионную плазмиду, полученную из pcDNA3.1. Эту плазмиду, несущую полноразмерный CD89 человека, трансфицировали в клетки FreeStyle™ 293F (Life Technologies) с использованием экспрессионной системы FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Клон № 2 HEK293F, стабильно трансфицированный 20 полноразмерным CD89 человека, отобрали с использованием 125 мкг/мл G418/генетицина (Gibco). Поверхностную экспрессию CD89 человека на трансфицированных клетках HEK293F подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием разведенного 1:20 ФЭ-конъюгированного мышинового антитела к CD89 человека (клон MIP8a; BioRad).

(c). Иммунизация и создание мышинных моноклональных антител к CD89 человека

В День 0 четырем мышам BALB/c (самки в возрасте 6-8 недель; Charles River Laboratories) вводили путем подкожной инъекции ≈ 500 мкл рекомбинантного меченого на С-конце полигистидином внеклеточного домена CD89 человека (ссылка NCBI SEQ NP_001991.1; Sino Biological Inc) и лизата клеток HEK293F, временно 30 трансфицированных CD89 человека (см. Пример 1 (a) выше), в эмульгированной «масло-в-воде» Sigma Adjuvant System® (SAS; Sigma); каждой мыши вводили путем инъекции 25 мкг рекомбинантного CD89 человека и лизата клеток HEK293F, трансфицированных CD89 человека (приготовленного из 5×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный CD89), в 250 мкл ФСБ, смешанного с 250 мкл SAS. В День 14 и День 35 28 гуморальные ответы у этих четырех мышей стимулировали путем подкожных

инъекций рекомбинантного CD89 человека и лизата клеток HEK293F, временно трансфицированных CD89 человека, в эмульгированном «масло-в-воде» SAS; каждой мышце вводили путем инъекции 25 мкг рекомбинантного CD89 человека и лизата клеток HEK293F, трансфицированных CD89 человека (приготовленного из 5×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный CD89), в 250 мкл ФСБ, смешанного с 250 мкл SAS. Наконец, в День 42 и День 43 двум мышам (мышь № 3 и № 4) вводили путем внутрибрюшинной инъекции рекомбинантный CD89 человека и лизат клеток HEK293F, временно трансфицированных CD89 человека, без адъюванта; каждой мышце вводили путем инъекции 20 мкг рекомбинантного CD89 человека и лизата клеток HEK293F, временно трансфицированных CD89 человека (приготовленного из 4×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный CD89), в 200 мкл ФСБ. Кроме того, в День 77 и День 78 двум мышам (мышь № 1 и № 2) вводили путем внутрибрюшинной инъекции рекомбинантный CD89 человека и лизат клеток HEK293F, временно трансфицированных CD89 человека, без адъюванта; каждой мышце вводили путем инъекции 20 мкг рекомбинантного CD89 человека и лизата клеток HEK293F, временно трансфицированных CD89 человека (приготовленного из 4×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный CD89), в 200 мкл ФСБ. В День 46 (для слияния I; мышь № 3 и № 4) или в День 81 (для слияния II; мышь № 1 и № 2) спленоциты этих иммунизированных мышей сливали с миеломными клетками SP2/0-Ag14 (DSMZ) с использованием стандартной гибридомной технологии (первоначально описанной Köhler and Milstein в Nature 1975, 256: 495), как описано ниже. В общих чертах, иммунизированных мышей умерщвляли. Спленоциты выделяли из селезенок и промывали в бессывороточной среде opti-MEM[®] I с GlutaMax (среда SF; Invitrogen). Миеломные клетки SP2/0-Ag14 в логарифмической фазе роста промывали в среде SF и добавляли к спленоцитам с получением соотношения спленоцитов и миеломных клеток 5:1. Затем клетки осаждали и удаляли супернатант. Затем добавляли по каплям один мл 37% (об./об.) раствора полиэтиленгликоля 4000 (Merck) в течение 60 секунд, после этого клетки инкубировали еще 60 секунд при 37°C. Затем при осторожном перемешивании медленно добавляли восемь мл среды SF, а затем 5 мл opti-MEM[®] I с GlutaMax/10% (об./об.) фетальной телячьей сыворотки (ФТС; Bodinco). Через 30 минут при комнатной температуре (КТ) клетки осаждали, промывали в среде opti-MEM[®] I с GlutaMax/10% ФТС для удаления остаточного полиэтиленгликоля и, наконец, высевали при концентрации $0,1 \times 10^6$ клеток/200 мкл на лунку в среду для селекции с аминоптеринем, т. е. opti-MEM[®] I с GlutaMax/10% ФТС, которая была дополнена 50x Hybri-Max[™] аминоптеринем (ингибитором синтеза ДНК *de novo*; Sigma). Начиная со Дня 7, среду для селекции с

аминоптерином восполняли каждые 2-3 дня, и в День 12-14 среду для селекции с аминоптерином заменяли opti-MEM I с GlutaMax/10% ФТС.

(d). Скрининг на наличие мышинных моноклональных антител к CD89 человека

5 Со Дня 12 по 14 после каждого слияния супернатанты растущих гибридом подвергали скринингу на наличие мышинных антител к CD89 человека класса IgG (т. е. «высокоаффинных» IgG в отличие от «низкоаффинных» IgM) с использованием ИФА с рекомбинантным меченым на С-конце полигистидином (внеклеточным) CD89 человека (rhuCD89; Sino Biological) в качестве целевого белка. С этой целью rhuCD89 наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ (25 нг/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных
10 планшетов для ИФА с половинным объемом (Corning) в течение 16-24 часов при 4–8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% бычьего сывороточного альбумина (БСА; Roche) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали с 50 мкл неразведенного супернатанта гибридомы/лунку в течение 1 часа при КТ. Одновременно с этим 50 мкл культуральной среды (opti-MEM® I с
15 GlutaMax/10% ФТС) и 50 мкл клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (BioRad) при 10 мкг/мл (разведенного в культуральной среде) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 связывание антител на rhuCD89 определяли с использованием разведенных 1:5000 конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) козьих
20 антител, специфичных в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при КТ, а затем добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание (оптическую плотность) антител на rhuCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания
25 микропланшетов (iMark; BioRad).

Со Дня 12 по 14 после слияния супернатанты растущих гибридом также подвергали скринингу и подтверждали продукцию мышинных антител к CD89 человека класса IgG (т. е. «высокоаффинных» IgG в отличие от «низкоаффинных» IgM) с использованием FACS с мембраносвязанным CD89 человека в качестве целевого белка. С
30 этой целью клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток
35 инкубировали со 100 мкл неразведенного супернатанта гибридомы/пробирку в течение 30

минут при 4°C. Одновременно с этим в качестве отрицательных контролей анализировали 100 мкл культуральной среды (opti-MEM® I с GlutaMax/10% ФТС), 100 мкл изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (разведенного в культуральной среде) и 100 мкл изотипического контрольного IgG2a мыши (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (разведенного в культуральной среде), также в качестве положительного контроля анализировали 100 мкл клона MIP8a мышиногo антитела к CD89 человека (BioRad) при 10 мкг/мл (разведенного в культуральной среде). Нетрансфицированные (т. е. отрицательные в отношении экспрессии мембраносвязанного CD89 человека) клетки НЕК293F дикого типа (WT) также анализировали в качестве клеток для отрицательного контроля для определения специфичности антител. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Двойные CD89-положительные гибридомы (т. е. rhuCD89⁺ в ИФА (данные не показаны) и мембранный CD89⁺ клетки НЕК293F в FACS (Фигура 1)) размножали и криоконсервировали. Супернатанты от этих двойных CD89-положительных гибридом не проявляли реактивности с нетрансфицированными клетками НЕК293F дикого типа (т. е. отрицательными по экспрессии мембраносвязанного CD89 человека). Как показано на Фигуре 1, этот подход дал 21 гибридому, продуцирующую мышиные антитела, специфичные в отношении CD89 человека. Затем супернатанты этих гибридом, продуцирующих мышиные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, тестировали на их способность блокировать связывание сывороточного IgA человека на его рецепторе CD89 (см. Пример 1 (е) ниже).

(е). Скрининг на наличие блокирующих CD89/IgA мышиных моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать влияние мышиных антител к CD89 человека на связывание сывороточного IgA человека с CD89 человека, способность мышиных антител к CD89 человека стерически препятствовать взаимодействию сывороточного IgA человека с CD89 человека определяли с использованием ИФА и FACS-анализа.

ИФА: rhuCD89 (Sino Biological) наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ (25 нг/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов для ИФА с половинным

объемом (Corning) в течение 16-24 часов при 4–8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% БСА (Roche) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали с 25 мкл неразведенного супернатанта гибридомы/лунку в течение 30 минут при КТ. Одновременно с этим 25 мкл культуральной среды (opti-MEM® I с GlutaMax/10% ФТС) и 25 мкл клона М1Р8а мышиногo антитела к CD89 человека (BioRad) при 20 мкг/мл (разведенного в культуральной среде) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. После этого (т. е. без промывки) в эти лунки добавляли 25 мкл очищенного (полученного из сыворотки) IgA человека (Bethyl Laboratories) при 2 мкг/мл (разведенного в культуральной среде) и инкубировали еще 30 минут при КТ. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 связывание сывороточного IgA человека на rhuCD89 определяли с помощью конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 1 мкг/мл в течение 1 часа при КТ. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 добавляли разведенный 1:10000 ПХ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 1 часа при КТ, после чего добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание (оптическую плотность) сывороточного IgA человека на rhuCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (iMark; BioRad).

FACS: клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃). Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл неразведенного супернатанта гибридомы/пробирку в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим в качестве отрицательных контролей анализировали 50 мкл культуральной среды (opti-MEM® I с GlutaMax/10% ФТС), 50 мкл изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 20 мкг/мл (разведенного в культуральной среде) и 50 мкл изотипического контрольного IgG2a мыши (BD Biosciences) при 20 мкг/мл (разведенного в культуральной среде), и в качестве положительного контроля анализировали 50 мкл клона М1Р8а мышиногo антитела к CD89 человека (BioRad) при 20 мкг/мл (разведенного в культуральной среде). После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 20 мкг/мл (разведенного в культуральной среде) и инкубировали еще 30

минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 2А, 6 из 21 исследованного супернатанта гибридом, продуцирующих мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9Н7, 10Е7, 26D6, 20В4 и 30С7), показали сильное/полное блокирование связывания сывороточного IgA человека с rhuCD89, в то время как 1 из 21 исследованного супернатанта гибридом, продуцирующих мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 16D6), показал промежуточное/частичное блокирование связывания сывороточного IgA человека с rhuCD89. В референсных целях очищенный клон М1Р8а мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он показал сильное/полное блокирование связывания сывороточного IgA человека с rhuCD89.

Как показано на Фигуре 2В, 6 из 21 исследованного супернатанта гибридом, продуцирующих мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9Н7, 10Е7, 26D6, 20В4 и 30С7), показали сильное/полное блокирование связывания сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека, в то время как 1 из 21 исследованного супернатанта гибридом, продуцирующих мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 16D6), показал промежуточное/частичное блокирование связывания сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека. В референсных целях очищенный клон М1Р8а мышинового антитела к CD89 человека (BioRad), хорошо известного блокатора CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он показал сильное/полное блокирование связывания сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека.

Мышиные антитела очищали из вышеупомянутых супернатантов гибридом, продуцирующих блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении

CD89 человека, с использованием колонок с белком G (GE Healthcare). Тяжелые и легкие цепи типировали по изотипическому классу с использованием набора для изотипирования мышинных моноклональных антител IsoStrip™ (Roche), и было обнаружено, что все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7), принадлежали к IgG1/κ. Кроме того, уровни ЛПС определяли с использованием LAL-хромогенного анализа по конечной точке (Hycult Biotech), и все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7), содержали <0,005 ЕЭ ЛПС/мкг IgG мыши. Впоследствии эти очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, тщательно тестировали на их относительную аффинность связывания в отношении CD89 человека, на их блокирующее действие на связывание сывороточного IgA человека с CD89 человека и на их блокирующее действие на опосредуемый сывороточным IgA человека фагоцитоз первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, и на опосредуемую сывороточным IgA человека миграцию указанных клеток, как описано в Примере 2 и 3. Кроме того, точную специфичность этих очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, исследовали путем перекрестной конкуренции с известными коммерческими блокирующими и не блокирующими CD89/IgA мышинными антителами, специфичными в отношении CD89 человека, путем картирования домена CD89 человека/бычьего Fcγ2R, путем межвидового связывания на CD89 яванской макаки и путем картирования эпитопа CD89 человека/яванской макаки, как описано в Примере 4.

Пример 2. Характеристика связывания блокирующих CD89/IgA мышинных моноклональных антител к CD89 человека

(а). Относительная аффинность связывания блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека в отношении CD89 человека

Для определения относительной аффинности связывания очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека в отношении CD89 человека использовали ИФА и FACS-анализ.

ИФА: rhuCD89 (Sino Biological) наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ (25 нг/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов для ИФА с половинным объемом (Corning) в течение 16-24 часов при 4–8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% БСА (Roche) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали с 50 мкл титрованного (в блокирующем буфере) очищенного мышинового антитела к CD89 человека/лунку в течение

1 часа при КТ. Одновременно с этим 50 мкл титрованного (в блокирующем буфере) очищенного клона MIP8a мышиногo антитела к CD89 человека (BioRad) анализировали в качестве положительного контроля. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 связывание антител на rhuCD89 определяли с помощью разведенных 1:5000 конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) козьих антител, специфичных в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при КТ, а затем добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание (оптическую плотность) антител на rhuCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (iMark; BioRad).

FACS: клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного мышиногo антитела к CD89 человека/пробирку в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) и 100 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного клона MIP8a мышиногo антитела к CD89 человека (BioRad) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 3А, все очищенные блокирующие CD89/IgA мышиные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо связывались с rhuCD89. На основании их профиля связывания установили следующую очередность по относительной аффинности (от высокой к более низкой аффинности): 9Н7=26D6=20В4>8F3=10E7=30С7(=MIP8a)>16D6. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышиногo антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA

(Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое связывание с rhuCD89.

5 Как показано на Фигуре 3B, все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо связались с мембранным CD89 человека. На основании их профиля связывания установили следующую очередность по относительной аффинности (от высокой к более низкой аффинности): 9H7=26D6=20B4(=MIP8a)>8F3=10E7=30C7>16D6, что согласуется с очередностью по относительной аффинности, обнаруженной в ИФА. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный
10 блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое связывание с мембранным CD89 человека.

(b). Степень CD89/IgA-блокирующей способности блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека

15 Чтобы проанализировать степень блокирования CD89/IgA очищенных мышинных антител к CD89 человека, способность очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека стерически препятствовать взаимодействию IgA человека с CD89 человека определяли с использованием ИФА и FACS-анализа.

ИФА: rhuCD89 (Sino Biological) наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ
20 (25 нг/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов для ИФА с половинным объемом (Corning) в течение 16-24 часов при 4–8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% БСА (Roche) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали с 25 мкл титрованного (в блокирующем буфере) очищенного мышинового антитела к CD89 человека/лунку в течение
25 30 минут при КТ. Одновременно с этим в качестве положительных контролей анализировали 25 мкл титрованного (в блокирующем буфере) очищенного клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (BioRad). После этого (т. е. без промывки) в эти лунки добавляли 25 мкл очищенного (полученного из сыворотки) IgA человека (Bethyl Laboratories) при 2 мкг/мл (разведенного в блокирующем буфере) и инкубировали еще 30
30 минут при КТ. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 связывание сывороточного IgA человека на rhuCD89 определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 1 мкг/мл в течение 1 часа при КТ. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 добавляли разведенный 1:10000
35 ПХ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение

1 часа при КТ, после чего добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание (оптическую плотность) сывороточного IgA человека на rhuCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (iMark; BioRad).

FACS: клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного мышинового антитела к CD89 человека/пробирку в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) и 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (BioRad) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного (полученного из сыворотки) IgA человека (Bethyl Laboratories) при 20 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/NaN₃) и инкубировали еще 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 4А, все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо предотвращали связывание сывороточного IgA человека с rhuCD89. На основании их профиля блокирования CD89/IgA установили следующую очередность (от сильной к более слабой степени блокирования CD89/IgA): 9H7=26D6=20B4>8F3=10E7=30C7(=MIP8a)>16D6. Интересно, что, по-видимому, существовала сильная положительная взаимосвязь между

степенью стерического блокирования связывания сывороточного IgA человека с rhuCD89 (этот пример) этих исследованных очищенных мышинных антител к CD89 человека и их соответствующей относительной аффинностью связывания в отношении rhuCD89 (см. Пример 2 (а) выше). В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое блокирование связывания сывороточного IgA человека с rhuCD89.

Как показано на Фигуре 4B, все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо предотвращали связывание сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека. На основании их профиля блокирования CD89/IgA установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени блокирования CD89/IgA): 9H7=26D6=20B4(=MIP8a)>8F3=10E7=30C7>16D6, что согласовывалось со степенью блокирования CD89/IgA, обнаруженной в ИФА. Интересно, что, по-видимому, существовала сильная положительная взаимосвязь между степенью стерического блокирования связывания сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека (этот пример) этих исследованных очищенных мышинных антител к CD89 человека и их соответствующей относительной аффинностью связывания в отношении мембранного CD89 человека (см. Пример 2 (а) выше). В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое блокирование связывания сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека.

Чтобы проанализировать степень блокирования CD89/IgA очищенных мышинных антител к CD89 человека, способность очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека стерически препятствовать взаимодействию секреторного IgA человека с CD89 человека определяли с использованием FACS-анализа.

Клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3). Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного мышинового антитела к CD89 человека/пробирку или без него в течение 30 минут при 4°C . Одновременно с этим в качестве положительного контроля анализировали 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (BioRad). После этого (т. е. без промывки) к этим

клеткам добавляли 50 мкл очищенного (полученного из молозива) IgA человека (BioRad) при 0,16 мкМ (разведенного в ФСБ/БСА/NaN₃) и инкубировали еще 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание секреторного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 4% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) секреторного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 4С, все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо предотвращали связывание секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека. На основании их профиля блокирования CD89/IgA установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени блокирования CD89/IgA): 9Н7=26D6=20В4(=MIP8a)>8F3=10E7=30C7>16D6, что согласовывалось со степенью блокирования CD89/IgA с использованием сывороточного IgA человека, обнаруженной в FACS (см. Фигуру 4В). Интересно, что, по-видимому, существовала сильная положительная взаимосвязь между степенью стерического блокирования связывания секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека (этот пример) этих исследованных очищенных мышинных антител к CD89 человека и их соответствующей относительной аффинностью связывания в отношении мембранного CD89 человека (см. Пример 2 (а) выше). В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое блокирование связывания секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека.

Описано, что CD89 человека является рецептором с низкой/умеренной аффинностью в отношении мономерного IgA человека ($K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$), в то время как иммунные комплексы IgA человека avidно связываются с CD89 человека (Bakema et al. Immunol Rev 2011; 4: 612-624). Чтобы имитировать иммунные комплексы IgA человека, IgA человека (полученный из сыворотки) (Bethyl Laboratories) нагревали при 63°C в течение 30 минут и охлаждали до КТ с последующим центрифугированием при 4°C,

12000×g в течение 2 минут для удаления любого нерастворимого белкового осадка. Этот термоагрегированный (полученный из сыворотки) IgA человека сравнивали с неагрегированным (полученным из сыворотки) IgA человека с использованием анализа методом эксклюзионной хроматографии и продемонстрировали, что
5 термоагрегированный IgA человека состоял на ≈40% из мономерного, на ≈15% из димерного и на ≈45% из тетрамерного или более высокого порядка мультимерного IgA человека, в то время как неагрегированный IgA человека состоял на ≈70% из мономерного, на ≈20% из димерного и на ≈10% из тримерного IgA человека. Затем способность наших очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89
10 человека стерически препятствовать взаимодействию этого термоагрегированного сывороточного IgA человека, в сравнении с неагрегированным сывороточным IgA человека, с мембраносвязанным CD89 человека определяли с помощью FACS-анализа (см. ниже).

Клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека
15 (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл очищенного мышинового антитела к CD89 человека при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) или
20 без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) и 50 мкл очищенного клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного блокатора CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111); BioRad) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) анализировали в качестве отрицательного
25 и положительного контролей, соответственно. Кроме того, 50 мкл очищенного клона A59 мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); BD Biosciences) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) и 50 мкл очищенного клона A3 мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992;
30 148: 1764-1770); Santa Cruz Biotechnology) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) анализировали в качестве дополнительных отрицательных контролей. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 20 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) и инкубировали еще 30 минут при 4°C. После
35 тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 связывание неагрегированного или

термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 5А, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, предотвращали связывание термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в степени, сходной с той, которая обнаружена для неагрегированного сывороточного IgA человека. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал блокирование связывания термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в степени, сходной с той, которая обнаружена для неагрегированного сывороточного IgA человека. Неожиданно, очищенный клон A59 и клон A3 мышинного антитела к CD89 человека, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), показали частичное (≈60%) блокирование связывания термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в степени, сходной с той, которая обнаружена для неагрегированного сывороточного IgA человека.

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 предотвращало связывание мономерного, димерного, тримерного, тетрамерного или более высокого порядка мультимерного сывороточного IgA человека (т. е. неагрегированного и термоагрегированного IgA) и димерного секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека. Обобщенные данные приведены в Таблице 1А (т. е. блокирование сывороточного IgA человека).

(с). Вытеснение сывороточного IgA человека с помощью блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать, способны ли очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела к CD89 человека вытеснять ранее насыщенный сывороточный IgA человека с CD89 человека, влияние очищенных мышинных антител к CD89 человека на вытеснение сывороточного IgA человека с мембраносвязанного CD89 человека на клетках 5 HEK293F определяли с помощью FACS-анализа.

Клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 10 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 20 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/NaN₃) в течение 30 минут при 4°C. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного мышинового антитела к CD89 человека при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) и 15 инкубировали еще 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) и 50 мкл очищенного клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111); BioRad) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве отрицательного и 20 положительного контролей, соответственно. Кроме того, 50 мкл очищенного клона A59 мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); BD Biosciences) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) и 50 мкл очищенного клона A3 мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 25 148: 1764-1770); Santa Cruz Biotechnology) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве дополнительных отрицательных контролей. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в 30 отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. 35 Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) неагрегированного

или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 5B, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, в различной степени вытесняли неагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека. На основании их степени вытеснения сывороточного IgA человека установили следующую очередность (от высокой к более слабой степени вытеснения IgA человека): 9H7=26D6(=MIP8a)>20B4>30C7>8F3=10E7>16D6. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также вытеснял неагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), не вытесняли неагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека.

Как показано на Фигуре 5B, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), также вытесняли термоагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека в различной степени и в несколько меньшей степени, чем было обнаружено с неагрегированным сывороточным IgA человека. На основании их степени вытеснения сывороточного IgA человека установили следующую очередность (от высокой к более слабой степени вытеснения IgA человека): 9H7=26D6(=MIP8a)>20B4>30C7>8F3=10E7. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также вытеснял неагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека, хотя и в несколько меньшей степени, чем было обнаружено с неагрегированным сывороточным IgA человека. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), не вытесняли термоагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, (16D6), 26D6, 20B4

и 30C7 показали вытеснение мономерного, димерного и тримерного сывороточного IgA человека (т. е. неагрегированного IgA) и в несколько меньшей степени тетрамерного или более высокого порядка мультимерного сывороточного IgA человека (т. е. термоагрегированного IgA) на ранее насыщенном мембранном CD89 человека.

5 Обобщенные данные приведены в Таблице 1А.

Таблица 1А. Профили блокирования IgA и вытеснения IgA очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, при насыщающей концентрации (т. е. 10 мкг/мл) на мембранном CD89 человека в условиях проточной цитометрии и в метаболически неактивных условиях (т. е. в присутствии NaN₃ и при низкой температуре окружающей среды (4°C)).

10

Блокирование IgA или вытеснение IgA мышинными антителами к CD89 человека

Антитело к CD89	Блокирование IgA (1-ое антитело и 2-ой IgA)		Вытеснение IgA (1-ый IgA и 2-ое антитело)	
	Неагрегированный IgA	Термоагрегированный IgA	Неагрегированный IgA	Термоагрегированный IgA
8F3	+++	+++	+	+
9H7	+++	+++	+++	+++
10E7	+++	+++	+	+
16D6	+++	+++	+	-
26D6	+++	+++	+++	+++
20B4	+++	+++	+++	++
30C7	+++	+++	++	+
Контрольный mIgG1	-	-	-	-
MP8a	+++	+++	+++	+++
A59	++	++	-	-
A3	++	++	-	-

- = отсутствие блокирования связывания IgA или отсутствие вытеснения IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (76-125% связывания IgA на Фигурах 5А и 5В), += слабое блокирование связывания IgA или слабое вытеснение IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (51-75% связывания IgA на Фигурах 5А и 5В), ++ = промежуточное блокирование связывания IgA или промежуточное вытеснение IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (26-50% связывания IgA на Фигурах 5А и 5В), +++ = сильное блокирование связывания IgA или

15

сильное вытеснение IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (0-25% связывания IgA на Фигурах 5А и 5В). Агр.=агрегированный.

Поскольку все описанные выше эксперименты (см. Пример 2 (b) и Пример 2 (c) выше) выполняли в (в условиях проточной цитометрии) метаболически неактивных условиях (т. е. при низкой температуре окружающей среды (4°C) и в присутствии NaN₃, обратимого ингибитора митохондриального дыхания, который предотвращает кэпирование, отщепление и интернализацию комплекса антитело-антиген после связывания антител с рецепторами), мы также исследовали способность наших очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека стерически препятствовать взаимодействию неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека в метаболических (активных) условиях следующим образом:

Условия блокирования IgA человека: клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при $1,70 \times 10^6$ клеток/мл в культуральную среду FreeStyle™ 293 (Life Technologies) с добавлением 125 мкг/мл G418/генетицина (Gibco) при 4°C. Затем 400 мкл/пробирку (т. е. $0,7 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл очищенного мышинного антитела к CD89 человека при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и 50 мкл очищенного клона MIP8a мышинного антитела к CD89 человека (хорошо известного блокатора CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111); BioRad) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Кроме того, 50 мкл очищенного клона A59 мышинного антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); BD Biosciences) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и 50 мкл очищенного клона A3 мышинного антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); Santa Cruz Biotechnology) при 100 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве дополнительных отрицательных контролей. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и инкубировали еще 24 часа в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃

связывание неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Условия вытеснения IgA человека: клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при $1,70 \times 10^6$ клеток/мл в культуральную среду FreeStyle™ 293 (Life Technologies) с добавлением 125 мкг/мл G418/генетицина (Gibco) при 4°C. Затем 400 мкл/пробирку (т. е. $0,7 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) в течение 30 минут при 4°C. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного мышинового антитела к CD89 человека при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и инкубировали еще 24 часа в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. Одновременно с этим 50 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и 50 мкл очищенного клона MIP8a мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного блокатора CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111); BioRad) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Кроме того, 50 мкл очищенного клона A59 мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); BD Biosciences) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и 50 мкл очищенного клона A3 мышинового антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); Santa Cruz Biotechnology) при 100 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве дополнительных отрицательных контролей. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека

определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 5С, очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 26B6, 20B4 и 30C7 сильно ингибировали связывание неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в метаболически активных условиях. Очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 16D6 показало частичное блокирование связывания неагрегированного сывороточного IgA человека, связывающегося с мембранным CD89 человека, в то время как мышинное антитело к CD89 человека 16D6 было неспособно блокировать связывание термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в метаболически активных условиях. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал сильное блокирование связывания неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в метаболически активных условиях. Неожиданно оказалось, что очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон А59 и клон А3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), показали частичное блокирование связывания неагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека, в то время как клон А59 и клон А3 мышинного антитела к CD89 человека были неспособны блокировать связывание термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека в метаболически активных условиях.

Как показано на Фигуре 5D, очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 26B6, 20B4 и 30C7 сильно вытесняли неагрегированный и термоагрегированный сывороточный IgA человека

на ранее насыщенном мембранном CD89 человека в метаболически активных условиях. Очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 16D6 могло частично вытеснять неагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека, в то время как мышинное антитело к CD89 человека 16D6 было неспособно вытеснять термоагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека в метаболически активных условиях. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также мог сильно вытеснять неагрегированный и термоагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека в метаболически активных условиях. Неожиданно оказалось, что очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), могли частично вытеснять неагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека, в то время как клон A59 и клон A3 мышинного антитела к CD89 человека были неспособны вытеснять термоагрегированный сывороточный IgA человека на ранее насыщенном мембранном CD89 человека в метаболически активных условиях.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 26D6, 20B4 и 30C7 ингибировали связывание мономерного, димерного и тримерного сывороточного IgA человека (т. е. неагрегированного IgA) и тетрамерного или более высокого порядка мультимерного сывороточного IgA человека (т. е. термоагрегированного IgA) на мембранном CD89 человека в метаболически активных условиях. Кроме того, блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 26D6, 20B4 и 30C7 также вытесняли мономерный, димерный и тримерный сывороточный IgA человека (т. е. неагрегированный IgA) и тетрамерный или более высокого порядка мультимерный сывороточный IgA человека (т. е. термоагрегированный IgA) на ранее насыщенном мембранном CD89 человека в метаболически активных условиях. Обобщенные данные приведены в Таблице 1B.

Таблица 1B: Профили блокирования IgA и вытеснения IgA очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, при насыщающей концентрации (т. е. 10 мкг/мл) на мембранном CD89 человека через 24 часа в метаболических (активных) условиях (т. е. в отсутствие NaN₃ и при физиологической температуре окружающей среды (37°C)).

Блокирование IgA или вытеснение IgA мышинными антителами к CD89 человека

Антитело к CD89	Блокирование IgA (1-ое антитело и 2-ой IgA)		Вытеснение IgA (1-ый IgA и 2-ое антитело)	
	Неагрегированный IgA	Термоагрегированный IgA	Неагрегированный IgA	Термоагрегированный IgA
8F3	+++	+++	+++	+++
9H7	+++	+++	+++	+++
10E7	+++	+++	+++	+++
16D6	+	-	+	-
26D6	+++	+++	+++	+++
20B4	+++	++	+++	++
30C7	+++	+++	+++	+++
Контрольный mIgG1	-	-	-	-
MIP8a	+++	+++	+++	+++
A59	++	-	++	-
A3	++	-	+	-

5
10
15

-= отсутствие блокирования связывания IgA или отсутствие вытеснения IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (76-125% связывания IgA на Фигурах 5C и 5D), += слабое блокирование связывания IgA или слабое вытеснение IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (51-75% связывания IgA на Фигурах 5C и 5D), ++= промежуточное блокирование связывания IgA или промежуточное вытеснение IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (26-50% связывания IgA на Фигурах 5C и 5D), +++= сильное блокирование связывания IgA или сильное вытеснение IgA на мембранном CD89 человека мышинными антителами к CD89 (0-25% связывания IgA на Фигурах 5C и 5D). Agr.=агрегированный.

15

Было описано, что клон MIP8a блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека индуцирует гибель клеток человека в CD89-экспрессирующих нейтрофильных гранулоцитах человека (Wehrli et al. J Immunol 2014, 193: 5649-5659). В зависимости от воспалительного микроокружения в этих нейтрофильных гранулоцитах человека была индуцирована каспазозависимая (обычно наблюдаемая во время апоптоза) или каспазозависимая (неапоптотическая) гибель клеток при воздействии клона MIP8a

бивалентного мышиноного антитела к CD89 человека. Таким образом, влияние созданных нами блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 на опосредуемую CD89 человека гибель клеток исследовали с использованием клеток НЕК293F, стабильно трансфицированных полноразмерным CD89 человека, в качестве клеток-мишеней.

Клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при $1,25 \times 10^6$ клеток/мл в культуральную среду FreeStyle™ 293 (Life Technologies) с добавлением 125 мкг/мл G418/генетицина (Gibco) при 4°C. Затем 400 мкл/пробирку (т. е. $0,5 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл очищенного мышиноного антитела к CD89 человека при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и 50 мкл очищенного клона MIP8a мышиноного антитела к CD89 человека (хорошо известного блокатора CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111); BioRad) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) анализировали в качестве отрицательного контроля и положительного контроля, индуцирующего гибель клеток, соответственно. Кроме того, 50 мкл очищенного клона A59 мышиноного антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); BD Biosciences) при 100 мкг/мл (в культуральной среде FreeStyle™ 293) и 50 мкл очищенного клона A3 мышиноного антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); Santa Cruz Biotechnology) при 100 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве дополнительных контролей. Затем (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл культуральной среды FreeStyle™ 293 и инкубировали еще 24 часа в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. После этой 24-часовой инкубации клетки окрашивали 0,02% раствором трипанового синего (Sigma-Aldrich), чтобы отличить живые клетки от мертвых. Для этого процент жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью гемоцитометра Бюркера. Кроме того, после тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ экспрессию фосфолипида фосфатидилсерина в мембране клеток, который известен как маркер апоптоза или гибели клеток, определяли с использованием конъюгированного с Alexa Fluor® 488 мышиноного антитела к фосфатидилсерину (Merck Millipore) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали конъюгированное с Alexa Fluor® 488 мышиноное антитело к CD19 человека (BD Biosciences). После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в

2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Экспрессию мембранного фосфатидилсерина (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

5 Как показано на Фигуре 5E, очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 9H7 и 26B6 запускали гибель клеток в клетках НЕК293F, экспрессирующих CD89 человека, примером чего являлось снижение жизнеспособности клеток (измеренное методом исключения трипанового синего) и увеличение уровней экспрессии фосфатидилсерина после обработки обоими мышинными антителами, специфичными в отношении CD89 человека. Как и ожидалось, клон MIP8a
10 коммерческого блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека также индуцировал гибель клеток в этих клетках НЕК293F, экспрессирующих CD89 человека, и эта индукция гибели клеток была сравнима с таковой, обнаруженной с использованием мышинных антител к CD89 человека 9H7 и 26B6. Неожиданно оказалось, что очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека,
15 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 не индуцировали значительной гибели клеток в этих клетках НЕК293F, экспрессирующих CD89 человека, также как и клон A59 и клон A3 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 9H7 и 26B6 индуцировали гибель
20 клеток в клетках, экспрессирующих мембранный CD89 человека, в то время как блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 не индуцировали гибели клеток в клетках, экспрессирующих мембранный CD89 человека.

(d). Степень способности блокировать CD89/IgA коммерческих прототипных мышинных антител к CD89 человека
25

CD89 человека состоит из короткого цитоплазматического хвоста, трансмембранной области и двух внеклеточных (EC) Ig-подобных доменов. За счет короткой междоменной шарнирной области эти два Ig-подобных домена EC уложены под углом примерно 90° друг к другу (Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970). Сайт связывания IgA человека на CD89 человека находится в дистальном относительно мембраны Ig-подобном домене EC1 и не находится в проксимальном относительно мембраны Ig-подобном домене EC2 (Wines et al. J Immunol 1999; 162: 2146-2153; Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722; Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386). Следовательно, общепризнано, что мышинные антитела к CD89 человека, которые связываются с доменом
30 EC1 CD89 человека, могут блокировать связывание IgA человека на CD89 человека, в то
35

время как мышинные антитела к CD89 человека, которые связываются с доменом EC2 CD89 человека, не способны блокировать связывание IgA человека на CD89 человека (Morton et al. Arch Immunol Ther Exp 2001; 49: 217-229; Bakema et al. Immunol Rev 2011; 4: 612-624). Более конкретно, клон MIP8a прототипного блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека распознает эпитоп в пределах домена EC1 CD89 человека (Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386), в то время как клон A59 и клон A3 прототипного не блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека распознают эпитоп в пределах домена EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722) и в пределах границы доменов EC1-EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), соответственно.

Неожиданно оказалось, что очищенный клон A59 и клон A3 хорошо известного не блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770) (при исследовании при 10 мкг/мл) показали частичное, но значительное ($\approx 60\%$) блокирование связывания как неагрегированного, так и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека (см. Пример 2 (b) выше). Таким образом, клон A59 и клон A3 мышинного антитела к CD89 человека изучали более подробно с использованием FACS-анализа, чтобы стерически препятствовать взаимодействию сывороточного IgA человека с мембраносвязанным CD89 человека.

Клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fc γ ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного клона A59 (BD Biosciences) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышинного антитела к CD89 человека или без них в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) и 50 мкл очищенного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) клона MIP8a мышинного антитела к CD89 человека (BioRad) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 20 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) и инкубировали еще 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 связывание неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на

мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигурах 6А и 6В, оба клона 59 и А3 мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, дозозависимо и частично ингибировали (т. е. максимальное ингибирование ≈60%) связывание неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека, в то время как их соответствующий изотипический контрольный IgG1 мыши не оказывает какого-либо влияния на связывание неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека, это демонстрирует, что ингибирующее действие клона 59 и клона А3 мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, на взаимодействие CD89/IgA было специфичным. В референсных целях очищенный клон М1Р8а мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он показал дозозависимое и полное предотвращение связывания неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека.

Эти результаты продемонстрировали, что клон 59 и А3 мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, прототипных антител, которые распознают эпитопы в пределах домена EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722) и в пределах границы доменов EC1-EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), соответственно, способны специфично и частично ингибировать связывание мономерного, димерного, тримерного, тетрамерного или более высокого порядка мультимерного сывороточного IgA человека (т. е. неагрегированного и термоагрегированного IgA) с мембранным CD89 человека. Скорее всего, клон 59 и клон А3 мышинных антител к CD89 человека могут изменять укладку мембранного CD89 человека после связывания с доменом EC2 или границей EC1-EC2 таким образом, что связывание сывороточного IgA человека с CD89 человека становится менее

«благоприятным» или оптимальным (в отличие от стерических препятствий со стороны антител к CD89 человека, которые распознают сайт связывания IgA (т. е. домен EC1) на CD89 человека).

Пример 3. Биологическая характеристика блокирующих CD89/IgA мышинных моноклональных антител к CD89 человека с использованием *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека

(а). Связывание блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека на первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека

Для определения связывания очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека на первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, использовали FACS-анализ.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здорового донора (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. Для целей сравнения клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше) и моноцитарную клеточную линию U937, экспрессирующую CD89 человека (щедрый подарок доктора Р. Т. Урбануса (RT Urbanus), Департамент гематологии Университетского медицинского центра Утрехта, Нидерланды) исследовали параллельно. После промывки в ФСБ гранулоциты помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma-Aldrich; ФСБ/БСА) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma-Aldrich), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл очищенного мышинного антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА) в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (Biolegend) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА) анализировали в качестве отрицательного контроля, и 100 мкл очищенного клона MIP8a (BioRad) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА), клона A59 (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА) мышинного антитела к CD89 человека анализировали в качестве положительных контролей. После тщательной промывки в ФСБ/БСА клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на

мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека измеряли с использованием проточного цитометра (Cyan; BeckmanCoulter).

Как показано на Фигуре 7А, все наши очищенные блокирующие CD89/IgА мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (при 10 мкг/мл), связывались с мембранным CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, выделенных от несколько доноров (n=5). На основании их профиля связывания на нейтрофильных гранулоцитах установили следующую очередность (от высокой к более низкой интенсивности связывания): 9Н7=26D6(=MIP8a)>10E7=30C7=20B4(=A59=A3) >8F3=16D6, которая неожиданно значительно отличалась от очередности связывания, обнаруженной для этих очищенных блокирующих CD89/IgА мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека (при 10 мкг/мл), с полноразмерным мембранным CD89 человека из клеток НЕК293F (см. Фигуру 7В), т. е. 8F3=9Н7=10E7=26D6 =20B4=30C7(=MIP8a=A59=A3)>16D6. Кроме того, очередность связывания, обнаруженная для очищенных блокирующих CD89/IgА мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека (при 10 мкг/мл), с мембранным CD89 человека из моноцитарных клеток U937 (см. Фигуру 7С), т. е. 9Н7=26D6 (=MIP8a)>10E7=30C7(=A59=A3)>8F3=16D6=20B4, по-видимому, является сходной (за исключением 20B4) с вышеупомянутой очередностью связывания, обнаруженной с использованием очищенных блокирующих CD89/IgА мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека (при 10 мкг/мл), с мембранным CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgА мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9Н7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 распознавали эпитопы на мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, на мембранном полноразмерном CD89 человека из клеток НЕК293F и на мембранном CD89 человека из моноцитарных клеток U937. Однако очередность связывания, обнаруженная с использованием этих блокирующих CD89/IgА мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, значительно отличалась при использовании в качестве клеток-мишеней *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека (от высокой к более низкой интенсивности связывания; 9Н7=26D6(=MIP8a) >10E7=30C7=20B4(=A59=A3)>8F3=16D6), в сравнении с клетками НЕК293F, экспрессирующими полноразмерный CD89 человека (от высокой к более низкой интенсивности связывания; 8F3=9Н7=10E7=26D6=20B4 =30C7(=MIP8a=A59=A3)>16D6) в этом сравнительном исследовании, это указывало на возможное распознавание (его отсутствие) множества изоформ мембранного CD89

человека на этих клетках. Действительно, известно, что человеческие первичные нейтрофильные гранулоциты и моноциты экспрессируют, помимо полноразмерного CD89 (также называемого Fc α RIa.1), два транскрипта варианта альтернативного сплайсинга CD89 человека (Patry et al. J Immunol 1996; 156: 4442-4448; Pleass et al. Biochem J 1996; 318: 771-777; Togo et al. FEBS Letters 2003; 535:20-209), в которых отсутствует (1) часть домена EC2 (Gly195 – Thr216; Swiss-Prot № P24071.2) CD89 человека (называемый Fc α RIa.2 или Δ 66EC2) или (2) весь домен EC2 (Gly121 – Thr216; Swiss-Prot № P24071.3) CD89 человека (называемый Fc α RIa.3 или Δ EC2). Поскольку мышиные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 при 10 мкг/мл связывались с клетками HEK293F (экспрессирующими только полноразмерный вариант CD89 человека) в сходной степени (за исключением низкоаффинного антитела 16D6; см. также Пример 2 (а) выше), в то время как связывание мышиного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 при 10 мкг/мл (подобно не блокирующим IgA человека клонам A59 и A3, которые распознают эпитоп в пределах домена EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722) и в пределах границы доменов EC1-EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), соответственно) было значительно ниже, чем связывание мышиного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 9H7 и 26D6 при 10 мкг/мл (подобно блокатору IgA человека MIP8a, который распознает эпитоп в пределах домена EC1 CD89 человека (Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386)) с первичными нейтрофильными гранулоцитами человека (экспрессирующими полноразмерный CD89 человека, Δ EC2 и в меньшей степени варианты Δ 66EC2), это свидетельствует о том, что (1) мышиное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 распознает либо эпитопы в пределах домена EC2, либо границы доменов EC1-EC2 CD89 человека (подобно не блокирующим IgA человека клонам A59 и A3, которые не способны связываться с вариантом альтернативного сплайсинга Fc α RIa.3, так как в нем отсутствует домен EC2), или распознает эпитопы в пределах домена EC1, недоступные в вариантах альтернативного сплайсинга (т.е., Fc α RIa.2 и/или Fc α RIa.3) CD89 человека из-за «абберрантной» укладки белка (в отличие от «нормальной» укладки белка полноразмерного CD89 человека/Fc α RIa.1) этих вариантов альтернативного сплайсинга, и (2) мышиное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 9H7 и 26D6 распознает эпитопы в пределах домена EC1 CD89 человека (подобно блокатору IgA человека MIP8a). Интересно, что вариант альтернативного сплайсинга Fc α RIa.3 (или Δ EC2) не связывается с полученным из сыворотки IgA человека, хотя в этом варианте сплайсинга присутствует

весь домен EC1 (т. е. сайт связывания IgA на CD89 человека), это указывает на «аберрантную» укладку белка (в отличие от «нормальной» укладки белка полноразмерного CD89 человека/Fc α R1a.1) этого варианта альтернативного сплайсинга Fc α R1a.3. Кроме того, полноразмерный CD89 человека, вероятно, образует две разные конформации, т. е. неактивное состояние в сравнении с активным состоянием CD89 человека, вследствие передачи сигналов изнутри наружу (Brandsma et al. Immunol Rev 2015, 268: 74-87). В результате неактивный CD89 человека показывает низкую аффинность связывания в отношении IgA человека, в то время как активный CD89 человека показывает высокую аффинность связывания в отношении IgA человека (Brackett et al. Blood 2001; 97: 3478-3483). Таким образом, конформационное изменение/состояние полноразмерного CD89 человека (при передаче сигналов изнутри наружу) также может приводить к дифференциальному связыванию созданных нами блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, с полноразмерным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека.

Соответственно, связывание мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 при 10 мкг/мл (подобно не блокирующим клонам A59 и A3, которые распознают эпитоп в пределах домена EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722) и в пределах границы доменов EC1-EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), соответственно) было значительно ниже, чем связывание мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 9H7 и 26D6 при 10 мкг/мл (подобно блокатору MIP8a, который распознает эпитоп в пределах домена EC1 CD89 человека (Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386)), с моноцитарными клетками U937, которые, как также известно, экспрессируют полноразмерный CD89 человека, варианты Δ EC2 и Δ 66EC2 (Patry et al. J Immunol 1996; 156: 4442-4448; Togo et al. FEBS Letters 2003; 535:20-209).

Эти результаты также продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 распознавали неpolиморфные эпитопы на мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, поскольку эти антитела однозначно связывались с нейтрофильными гранулоцитами человека, выделенными от всех 5 обследованных доноров.

(b). Блокирование опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, с использованием блокирующих CD89/IgA мышинных моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека ингибировать фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ гранулоциты ресуспендировали при $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich). Затем 100 мкл/лунку (т. е. $0,2 \times 10^6$ клеток в 96-луночных планшетах с плоским дном; Greiner) этих клеток инкубировали с титрованным (в RPMI/10% ФТС) очищенным мышинным антителом к CD89 человека в течение 20 минут при 4°C. Одновременно с этим титрованный (в RPMI/10% ФТС) очищенный изотипический контрольный IgG1 мыши (Biolegend) анализировали в качестве отрицательного контроля, и титрованный (в RPMI/1% ФТС) очищенный клон MIP8a (BioRad), клон A59 (BD Biosciences) и клон A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышинового антитела к CD89 человека анализировали в качестве контролей. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 1,2 мкл покрытых очищенным (полученным из сыворотки) IgA человека (MP Biomedicals) флуоресцентных латексных гранул (размером 1 мкм и модифицированный карбоксилатом полистирол; Sigma-Aldrich) при отношении клеток к гранулам 1:60 (приготовление IgA-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383) и инкубировали еще 30 минут при 37°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали флуоресцентные латексные гранулы, покрытые БСА (Sigma-Aldrich), при отношении клеток к гранулам 1:60 (приготовление БСА-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383). После промывки в RPMI/10% ФТС и ресуспендирования в ФСБ/0,1% БСА (Sigma-Aldrich) фагоцитоз флуоресцентных латексных гранул, опосредуемый сывороточным IgA человека (среднегеометрическая интенсивность флуоресценции использовалась для расчета фагоцитарного индекса в соответствии с Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383), мембранным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека измеряли с использованием проточного цитометра (Cyan; Beckman Coulter).

Как показано на Фигуре 8, все очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо ингибировали опосредуемый сывороточным IgA человека фагоцитоз в *ex vivo* первичных

нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Основываясь на их степени ингибирования опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени ингибирования опосредуемого IgA фагоцитоза): 8F3=9H7=10E7=26D6=30C7(=MIP8a)>20B4>16D16. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое ингибирование опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза в *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), не показали вообще, показали очень незначительное или слабое ингибирование опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза в *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 ингибировало опосредуемую сывороточным IgA человека фагоцитарную активность *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека. Обобщенные данные приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Блокирующий эффект очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, на фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека.

Блокирование фагоцитоза покрытых IgA латексных гранул с помощью мышинных антител к CD89 человека

Антитело к CD89	Донор 1	Донор 2	Донор 3
8F3	+++	+++	++
9H7	+++	+++	++
10E7	+++	+++	++

16D6	-/+	+/>++	++
26D6	+++	+++	++
20B4	+++	+++	+
30C7	+++	+++	++
Контрольный mIgG1	-	-	-
MIP8a	+++	+++	++
A59	-/+	-/+	+
A3	-	-/+	+

-= отсутствие блокирования фагоцитоза латексных гранул, покрытых IgA, за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, += слабое блокирование фагоцитоза латексных гранул, покрытых IgA, за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, ++= промежуточное блокирование фагоцитоза латексных гранул, покрытых IgA, за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, +++= сильное блокирование фагоцитоза латексных гранул, покрытых IgA, за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89.

(с). Блокирование опосредуемой сывороточным IgA человека миграции первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, опосредуемого сывороточным IgA человека хемотаксиса указанных клеток и опосредуемой сывороточным IgA человека продукции лейкотриена B4 из указанных клеток с использованием блокирующих CD89/IgA мышиных моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека ингибировать (1) опосредуемую сывороточным IgA человека миграцию первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, (2) опосредуемый сывороточным IgA человека хемотаксис указанных клеток и (3) опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию нейтрофил-хемотактантного лейкотриена B4 (LTB4) из указанных клеток.

Анализ двумерной (2-D) миграции: первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield)

с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH_4Cl . Затем эти первичные нейтрофильные гранулоциты человека метили 1 мкМ флуоресцентного кальцеина-АМ (Molecular Probes) в течение 30 минут при 37°C . После промывки эти меченые кальцеином-АМ гранулоциты ресуспендировали при $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI 5 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем 100 мкл меченых кальцеином-АМ гранулоцитов (т. е. $0,25 \times 10^6$ клеток/лунку в 96-луночных планшетах с плоским дном; Greiner) инкубировали с 20 мкг/мл (в RPMI/10% ФТС) очищенного мышинового антитела к CD89 человека в течение 20 минут при 4°C . Одновременно с этим 20 мкг/мл (в RPMI/10%ФТС) очищенного изотипического 10 контрольного IgG1 мыши (Biolegend) анализировали в качестве отрицательного контроля, и 20 мкг/мл (в RPMI/10%ФТС) очищенного клона MIP8a (BioRad), клона A59 (BD Biosciences) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышинового антитела к CD89 человека анализировали в качестве контролей. После этого добавляли 150 мкл RPMI/10% ФТС на лунку и клетки оставляли на 10 минут, чтобы они снова стали монослоями. После этого (т. 15 е. без промывки) к этим монослоям клеток осторожно добавляли 10 мкл гранул сефарозы 4В, покрытых очищенным (полученным из сыворотки) IgA человека (MP Biomedicals) (размером 90 мкм и активированных бромцианом; GE Healthcare) (приготовление 3 мкг/мл IgA-гранул, см. Van der Steen et al. Gastroenterol 2009; 137: 2018-2029), и инкубировали еще 40 минут при 37°C . Одновременно с этим покрытые БСА (Sigma-Aldrich) гранулы 20 сефарозы 4В анализировали в качестве отрицательного контроля (приготовление 3 мкг/мл БСА-гранул, см. Van der Steen et al. Gastroenterol 2009; 137: 2018-2029). Затем супернатанты собирали и использовали для анализа хемотаксиса и ИФА LBT4 (см. ниже), и гранулы сефарозы промывали для удаления несвязанных/немигрировавших гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ. Затем гранулоциты лизировали в буфере с 0,2% 25 (масс./об.) бромиде гексадецилтриметиламмония (Sigma-Aldrich) в течение 30 минут при КТ, и высвобожденный кальцеин-АМ (отражающий число IgA-связанных/мигрировавших гранулоцитов) измеряли в 96-луночных планшетах с плоским дном (Greiner) с использованием флуорометра (FLUOstar/POLARstar; BMG Labtech). Число IgA-связанных/мигрировавших *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека количественно 30 определяли с использованием стандартной кривой с известным числом лизированных гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ (т. е. $0-0,3 \times 10^6$ клеток/лунку).

Анализ хемотаксиса: первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с 35 последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH_4Cl . Затем эти

первичные нейтрофильные гранулоциты человека метили 1 мкМ флуоресцентного кальцеина-АМ (Molecular Probes) в течение 30 минут при 37°C. После промывки эти меченые кальцеином-АМ гранулоциты ресуспендировали при $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich).

5 Для измерения хемотаксиса лунки нижнего отсека камеры Бойдена (Neuro Probe) заполняли 29 мкл супернатантов из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, стимулированных покрытыми IgA гранулами сефарозы (т. е. от другого здорового донора, см. выше). Одновременно с этим только среду RPMI/10% ФТС и очищенный 1 или 10 нМ LTB4 (в RPMI; Sigma-Aldrich) анализировали в качестве отрицательного и

10 положительного контролей, соответственно. Затем нижний отсек покрывали поликарбонатным фильтром с размером пор 3 мкм, покрытым поливинилпирролидоном (Neuro Probe), с последующей сборкой верхнего отсека на нижнем отсеке камеры Бойдена. После этого в лунки верхнего отсека добавляли 50 мкл гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ (т. е. $0,05 \times 10^6$ клеток/лунку). После инкубации в течение 40 минут при

15 37°C определяли хемотаксис *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека из верхнего отсека в лунки нижнего отсека. С этой целью гранулоциты в нижнем отсеке лизировали в буфере с 0,1% (масс./об.) бромидом гексадецилтриметиламмония (Sigma-Aldrich) в течение 30 минут при КТ, и высвобожденный кальцеин-АМ (отражающий число хемотаксических гранулоцитов) измеряли в 96-луночных планшетах с плоским дном (Greiner) с

20 использованием флуорометра (FLUOstar/POLARstar; BMG Labtech). Число хемотаксических *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, индуцированных покрытыми IgA гранулами сефарозы, количественно определяли с использованием стандартной кривой с известным числом лизированных гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ (т. е. $0-0,05 \times 10^6$ клеток/лунку).

25 LTB4 ИФА: Уровни LTB4 измеряли в супернатантах от *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, стимулированных покрытыми IgA гранулами сефарозы (см. выше). С этой целью коммерчески доступный набор для конкурентного ИФА LTB4 (R&D Systems) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

Как показано на Фигуре 9А, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA

30 мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, при 20 мкг/мл ингибировали опосредуемую гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, миграцию *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. В референсных

35 целях очищенный клон МР8а мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный

блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал ингибирование опосредуемой гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, миграции *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от
5 трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон А59 и клон А3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), показали сильно варьируемое (т. е. отсутствие, слабое или промежуточное) ингибирование опосредуемой гранулами сефарозы, покрытыми
10 сывороточным IgA человека, миграции *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека.

Как показано на Фигуре 9B, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, при 20 мкг/мл ингибировали опосредуемый гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA
15 человека, хемотаксис *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. В референсных целях очищенный клон М1Р8а мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный
20 блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал ингибирование опосредуемого гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, хемотаксиса *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от
25 трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон А59 и клон А3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), показали сильно варьируемое (т. е. отсутствие, промежуточное или сильное) ингибирование опосредуемого гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, хемотаксиса *ex vivo* первичных нейтрофильных
30 гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека.

Как показано на Фигуре 9C, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, при 20 мкг/мл ингибировали опосредуемую гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA
человека, продукцию хемоаттрактантного LTB4 *ex vivo* первичными нейтрофильными
35 гранулоцитами человека, экспрессирующими мембранный CD89 человека, выделенными от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

В референсных целях очищенный клон МР8а мышиногo антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал ингибирование опосредуемой гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, продукции хемоаттрактантного LTB4 *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими мембранный CD89 человека, выделенными от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Неожиданно оказалось, что очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон А59 и клон А3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), также показали ингибирование опосредуемой гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, продукции хемоаттрактантного LTB4 *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими мембранный CD89 человека.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 ингибировало опосредуемую сывороточным IgA человека миграцию, хемотаксис и высвобождение хемоаттрактантного LTB4 из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека. Обобщенные данные приведены в Таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Блокирующий эффект очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, на индуцированную гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, двумерную миграцию *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека.

Блокирование индуцированной гранулами сефарозы, покрытыми IgA, двумерной миграции с помощью мышинных антител к CD89 человека

Антитело к CD89	Донор 1	Донор 2	Донор 3
8F3	+++	++	++/+++
9H7	+++	++	+++
10E7	+++	++/+++	+++
16D6	+++	++	++/+++
26D6	+++	+++	+++
20B4	+++	+++	+++
30C7	+++	+++	++/+++

Контрольный mIgG1	-	-	-
MIP8a	+++	+++	+++
A59	-	+	++
A3	-	H/O	++

- = отсутствие блокирования индуцированной гранулами сефарозы, покрытыми IgA, двумерной миграции за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, += слабое блокирование индуцированной гранулами сефарозы, покрытыми IgA, двумерной миграции за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, ++ = промежуточное блокирование индуцированной гранулами сефарозы, покрытыми IgA, двумерной миграции за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, +++ = сильное блокирование индуцированной гранулами сефарозы, покрытыми IgA, двумерной миграции за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89. H/O = не определено.

- 5 **Таблица 4.** Блокирующий эффект очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител, специфичных в отношении CD89 человека, на индуцированный гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, (1) хемотаксис и (2) продукцию LTB4 *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека.

Блокирование индуцированного гранулами сефарозы, покрытыми IgA, хемотаксиса и продукции LTB4 с помощью мышиных антител к CD89 человека

Антитело к CD89	Донор 1		Донор 2		Донор 3	
	Хемотаксис	LTB4	Хемотаксис	LTB4	Хемотаксис	LTB4
8F3	+++ / +++	+++ / +++	++	++	+++	++ / +++
9H7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10E7	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++	+++	+++
16D6	+++ / +++	+++ / +++	++	+	+++	++ / +++
26D6	++	+++ / +++	-	+++	+++	+++
20B4	+++ / +++	+++ / +++	++	++	+++	+++
30C7	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++	++ / +++
Контрольны	-	-	-	-	-	-

й mIgG1						
MIP8a	++/+++	++/+++	++/+++	+++	++	+++
A59	-	++/+++	++	++	+++	+++
A3	-	++	H/O	H/O	+++	+++

5
10
15
20
25
30

-= отсутствие блокирования индуцированного гранулами сефарозы, покрытыми IgA, хемотаксиса и продукции LTB4 за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, += слабое блокирование индуцированного гранулами сефарозы, покрытыми IgA, хемотаксиса и продукции LTB4 за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, ++= промежуточное блокирование индуцированного гранулами сефарозы, покрытыми IgA, хемотаксиса и продукции LTB4 за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89, +++= сильное блокирование индуцированного гранулами сефарозы, покрытыми IgA, хемотаксиса и продукции LTB4 за счет мембранного CD89 человека с помощью мышиных антител к CD89. H/O=не определено.

(d). Блокирование связывания сывороточного IgA человека на первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, и опосредуемой сывороточным IgA человека продукции лактоферрина из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с использованием блокирующих CD89/IgA мышиных моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека (1) стерически препятствовать взаимодействию сывороточного IgA человека с первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, и (2) ингибировать опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию лактоферрина из указанных клеток.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. Затем эти первичные нейтрофильные гранулоциты человека метили 1 мкМ флуоресцентного кальцеина-AM (Molecular Probes) в течение 30 минут при 37°C. После промывки эти меченые кальцеином-AM гранулоциты ресуспендировали при 2,0×10⁶ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем

100 мкл меченых кальцеином-АМ гранулоцитов (т. е. $0,2 \times 10^6$ клеток/лунку) инкубировали с титрованным (в RPMI/10% ФТС) очищенным мышинным антителом к CD89 человека в течение 20 минут при 4°C. Одновременно с этим титрованный (в RPMI/10%ФТС) очищенный изотипический контрольный IgG1 мыши (Biolegend) анализировали в качестве отрицательного контроля, и титрованный (в RPMI/10%ФТС) очищенный клон MIP8a (BioRad), клон A59 (BD Biosciences) и клон A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышинового антитела к CD89 человека анализировали в качестве контролей. После этого (т. е. без промывки) 100 мкл этих клеток (т. е. $0,2 \times 10^6$ клеток/лунку) добавляли в 96-луночные планшеты для ИФА с плоским дном (Nunc-Immuno MaxiSorp), которые предварительно покрывали либо 100 мкл/лунку очищенного IgA человека (полученного из сыворотки) (MP Biomedicals) при 10 мкг/мл, либо 100 мкл/лунку БСА (используемого в качестве отрицательного контроля; Sigma-Aldrich) при 10 мкг/мл. После инкубации в течение 30 минут при 37°C супернатанты (180 мкл/лунку) собирали для удаления несвязавшихся гранулоцитов, и эти супернатанты использовали (после нескольких этапов очистки центрифугированием) для измерения уровней продукции лактоферрина (использованного в качестве маркера дегрануляции; см. ниже). После промывки планшетов гранулоциты лизировали в буфере с 0,2% (масс./об.) бромида гексадецилтриметиламмония (Sigma-Aldrich) в течение 30 минут при КТ, и высвобожденный кальцеин-АМ (отражающий число IgA-связанных гранулоцитов) измеряли в 96-луночных планшетах с плоским дном (Greiner) с использованием флуорометра (FLUOstar/POLARstar; BMG Labtech). Число IgA-связанных *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека количественно определяли с использованием стандартной кривой с известным числом лизированных гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ (т. е. $0-0,3 \times 10^6$ клеток/лунку).

Продукцию лактоферрина измеряли в супернатантах первичных нейтрофильных гранулоцитов человека (представляющих степень дегрануляции), которые стимулировали связанным с планшетом сывороточным IgA человека (см. выше). Для этого 96-луночные планшеты для ИФА с плоским дном (Nunc-Immuno MaxiSorp) покрывали 100 мкл/лунку кроличьих антител к лактоферрину человека (1:5000; Sigma-Aldrich) в течение 16-24 часов при 4-8°C. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали 200 мкл/лунку ФСБ/0,05% Tween 20/0,5% БСА (Sigma-Aldrich) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали со 100 мкл/лунку супернатанта в разведении 1:2 (в блокирующем буфере) в течение 1 часа при 37°C. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты инкубировали с мечеными щелочной фосфатазой кроличьими детектирующими антителами к лактоферрину человека (1:2500; MP

Biomedicals) в течение 1 часа при 37°C. После добавления Р-нитрофенилфосфата (Sigma-Aldrich) измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов (iMark; Bio-Rad). Очищенный лактоферрин человека (Sigma-Aldrich) использовали в качестве стандарта для расчета количества лактоферрина, высвобождаемого *ex vivo* человеческими нейтрофильными гранулоцитами, стимулированными сывороточным IgA человека.

Как показано на Фигуре 10А, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), дозозависимо ингибировали связывание *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, с сывороточным IgA человека, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. На основании их степени ингибирования установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени ингибирования): 9H7=10E7=26D6=30C7(=MIP8a)>8F3>20B4. В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое ингибирование связывания *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, с сывороточным IgA человека, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), не показали ингибирования связывания *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, с сывороточным IgA человека.

Как показано на Фигуре 10В, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), дозозависимо ингибировали опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию лактоферрина *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, выделенными от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. На основании их степени ингибирования установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени ингибирования): 9H7=10E7=26D6=30C7(=MIP8a)>8F3>20B4. Интересно, что степень ингибирования опосредуемой сывороточным IgA человека продукции лактоферрина нейтрофильными гранулоцитами человека с помощью этих исследованных очищенных мышинных антител к CD89 человека отражала их соответствующую степень

ингибирования связывания нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с сывороточным IgA человека (сравните Фигуру 10B с Фигурой 10A). В референсных целях очищенный клон MIP8a мышинового антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое ингибирование IgA-опосредуемой продукции лактоферрина *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, выделенными от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. Напротив, очищенные мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба являются хорошо известными не блокирующими CD89/IgA антителами (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), не показали ингибирования IgA-опосредуемой продукции лактоферрина *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, выделенными от трех здоровых индивидуумов.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 26D6, 20B4 и 30C7 ингибировало связывание *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с сывороточным IgA человека и соответствующую IgA-опосредуемую продукцию лактоферрина (маркера дегрануляции). Обобщенные данные приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Блокирующий эффект очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, на (1) связывание *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с планшетами, покрытыми IgA, и на (2) их соответствующую IgA-опосредуемую продукцию лактоферрина.

25

Блокирование связывания IgA и соответствующей IgA-опосредуемой продукции лактоферрина с помощью мышинных антител к CD89 человека

Антитело к CD89	Донор 1		Донор 2		Донор 3	
	Связывание IgA	Лактоферрин	Связывание IgA	Лактоферрин	Связывание IgA	Лактоферрин
8F3	+	++	+++	+++	++	+++
9H7	+++	+++	+++	+++	+++	++
10E7	++	++	+++	+++	+++	+++
16D6	-	-	-	-	+	-

26D6	+++	+++	+++	+++	+++	++
20B4	+	+	+++	+++	+	+
30C7	++	+++	+++	+++	+++	+++
Контроль ный mIgG1	-	-	-	-	-	-
MIP8a	+++	+++	+++	+++	+++	++
A59	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-

5
10
15
20
25

-= отсутствие блокирования связывания гранулоцитов, экспрессирующих CD89 человека, с планшетами, покрытыми IgA, и их соответствующей IgA-опосредуемой продукции лактоферрина с помощью мышиных антител к CD89, += слабое блокирование связывания гранулоцитов, экспрессирующих CD89 человека, с планшетами, покрытыми IgA, и их соответствующей IgA-опосредуемой продукции лактоферрина с помощью мышиных антител к CD89, ++= промежуточное блокирование связывания гранулоцитов, экспрессирующих CD89 человека, с планшетами, покрытыми IgA, и их соответствующей IgA-опосредуемой продукции лактоферрина с помощью мышиных антител к CD89, +++= сильное блокирование связывания гранулоцитов, экспрессирующих CD89 человека, с планшетами, покрытыми IgA, и их соответствующей IgA-опосредуемой продукции лактоферрина с помощью мышиных антител к CD89.

(е). Блокирование опосредуемого сывороточным IgA человека высвобождения нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с использованием блокирующих CD89/IgA мышиных моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека ингибировать опосредуемое сывороточным IgA человека высвобождение NET из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови нескольких здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ гранулоциты ресуспендировали при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI 1640

(Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich). Затем $1,0 \times 10^5$ клеток/200 мкл/лунку (в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Greiner)) инкубировали с 20 мкг/мл очищенного мышинового антитела к CD89 человека в течение 20 минут при 4°C. Одновременно с этим очищенный изотипический контрольный IgG1 мыши (Biolegend) анализировали в качестве отрицательного контроля. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 3,0 мкл нефлуоресцентных латексных гранул, покрытых очищенным (полученным из сыворотки) IgA человека (MP Biomedicals), (размером 0,9 мкм и модифицированный карбоксилатом полистирол; Sigma-Aldrich), при отношении клеток к гранулам 1:300 (приготовление IgA-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383) и инкубировали еще 30 минут при 37°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали нефлуоресцентные латексные гранулы, покрытые БСА (Sigma-Aldrich), при отношении клеток к гранулам 1:300 (приготовление БСА-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383). После этого клетки дважды промывали RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем эти клетки переносили в 96-луночные черные планшеты с плоским дном (FLUOTRAC™ 200; Greiner) при $1,0 \times 10^5$ клеток/200 мкл/лунку и инкубировали еще 3 часа при 37°C. Когда показано, добавляли 100 мкг/мл ДНКазы I. Затем исследовали высвобождение внеклеточной ДНК путем добавления 2,5 мкг/мл SYTOX® Green (Invitrogen). Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием флуорометра (FLUOstar/POLARstar; BMG Labtech).

Как показано на Фигуре 23, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, ингибировали опосредуемое сывороточным IgA человека высвобождение NET из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, выделенных от восьми здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 ингибировало опосредуемое IgA человека высвобождение NET из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека.

(f). Индукция гибели клеток в первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, с использованием блокирующих CD89/IgA мышинных моноклональных антител к CD89 человека

Было описано, что клон MIP8a блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека индуцирует гибель клеток человека в CD89-экспрессирующих нейтрофильных гранулоцитах человека (Wehrli et al. J Immunol 2014, 193: 5649-5659). В зависимости от

воспалительного микроокружения в этих нейтрофильных гранулоцитах человека была индуцирована каспазозависимая (обычно наблюдаемая во время апоптоза) или каспазозависимая (неапоптотическая) гибель клеток при воздействии клон МIP8a бивалентного мышинового антитела к CD89 человека. Таким образом, эффект созданных нами блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 на опосредуемую CD89 человека гибель клеток исследовали с использованием непраймированных (для имитации невоспалительного состояния) и ЛПС-праймированных (для имитации воспалительного состояния) первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, в качестве клеток-мишеней.

10 Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови нескольких здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ гранулоциты ресуспендировали при 2,0×10⁶ клеток/мл в RPMI 1640
15 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich). Затем эти клетки оставляли непраймированными или праймировали ЛПС (100 нг/мл сверхчистого ЛПС из E. coli 0111:B4; InvivoGen) в течение 5 минут при 37°C. После промывки эти гранулоциты ресуспендировали при 2,0×10⁶ клеток/мл в среде RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем
20 250 мкл гранулоцитов (т. е. 0,5×10⁶ клеток/лунку в 96-луночных планшетах с плоским дном; Falcon) инкубировали с 10 мкг/мл очищенного мышинового антитела к CD89 человека в комбинации с 10 мкг/мл сшивающих козьих антител, специфичных в отношении IgG мыши (Southern Biotech), в течение 5 часов при 37°C. Одновременно с этим очищенный изотипический контрольный IgG1 мыши (Biolegend) и очищенный клон МIP8a мышинового
25 антитела к CD89 человека (BioRad) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. После тщательной промывки в охлажденном на льду ФСБ, содержащем 0,1% БСА (Sigma-Aldrich; ФСБ/БСА), гранулоциты окрашивали 3 мкМ красного флуоресцентного красителя для контрастного окрашивания ДНК йодида пропидия в течение 30-60 минут при 4°C. После тщательной промывки в
30 ФСБ/БСА клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА в течение 30 минут при 4°C. Процент гибели клеток (на основании окрашивания йодидом пропидия) в *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека определяли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur или Fortessa; BD Biosciences).

35 Как показано на Фигуре 24, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, и клон МIP8a

коммерческого блокирующего CD89/IgA мышиногo антитела к CD89 человека не запускали гибель клеток в непраймированных *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов. Напротив, клон MIP8a коммерческого блокирующего CD89/IgA мышиногo антитела к CD89 человека индуцировал значительную гибель клеток в ЛПС-праймированных *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами, в то время как все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, не запускали гибель клеток в этих ЛПС-праймированных *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7 не индуцировали гибель клеток в *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, в невоспалительных (т. е. после отсутствия праймирования) и воспалительных (т. е. после праймирования ЛПС) условиях.

(g). Блокирование экспериментально индуцированного опосредуемого IgA человека аутоиммунного заболевания кожи, линейного IgA-буллезного дерматоза, с использованием блокирующего CD89/IgA мышиногo моноклонального антитела к CD89 человека 10E7

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенного блокирующего CD89/IgA мышиногo антитела к CD89 человека 10E7, определяли способность созданного блокирующего CD89/IgA мышиногo антитела к CD89 человека 10E7 ингибировать экспериментально индуцированное опосредуемое IgA человека аутоиммунное заболевание кожи, линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз (LABD).

LABD представляет собой хроническое заболевание кожи, связанное с аутоантителами IgA, которое характеризуется субэпидермальными волдырями с плотными воспалительными инфильтратами, в которых преобладают CD89-экспрессирующие нейтрофильные гранулоциты (Van der Steen et al. J Immunol 2012; 189: 1594-1601). У пациентов с LABD линейное отложение IgA обычно обнаруживается в дермо-эпидермальном соединении, и эти аутоантитела IgA в основном направлены против трансмембранного гемидесмосомального антигена BP180/коллагена XVII (Otten et al. Curr mol Med 2014; 14: 69-95), индуцируя устойчивое привлечение нейтрофильных гранулоцитов посредством перекрестного связывания CD89 человека. Как следствие, постоянная активация (т. е. активными формами кислорода и продуцированием

провоспалительных цитокинов) и инфильтрация (т. е. локальным высвобождением хемоаттрактанта LTB₄) CD89-экспрессирующих нейтрофильных гранулоцитов вызывают тяжелое повреждение тканей и ухудшение симптомов у пациентов с LABD.

In vivo модель LABD на мышах: У двойных трансгенных по CD89 человека/IgA человека мышей (Tg huCD89/huIgA), у которых отсутствует мышиный гомолог CD89, экспрессия, регуляция, взаимодействие с IgA человека и функция CD89 человека имитируют ситуацию у человека (Van Egmond et al, Blood 1999; 93: 4387-4394). Мышам Tg huCD89/huIgA (с равномерным распределением по самкам и самцам), которые экспрессируют мембранный CD89 человека на своих циркулирующих мышиных нейтрофильных гранулоцитах (Van Egmond et al, Blood 1999; 93: 4387-4394), вводили путем подкожной инъекции 10 мкл (ауто)антител IgA человека к мышиному коллагену XVII в дозе 7 мг/мл (проф. д-р М. ван Эгмонд (M. van Egmond), Департамент молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, VUmc, Амстердам, Нидерланды) в правые уши или 10 мкл ФСБ в левые уши в День 0, 2, 4, 6, 8, 10 и 12. Приток мышиных нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих CD89 человека, в местах инъекций отслеживали с использованием обработки очищенным блокирующим CD89/IgA мышиным антителом к CD89 человека 10E7 и без него. С этой целью в День 7 и 11 вводили путем внутрибрюшинной инъекции 100 мкл очищенного блокирующего CD89/IgA мышиного антитела к CD89 человека 10E7 при 1,5 мг/мл (схему лечения см. на Фигуре 31А). Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали 100 мкл изотипического контрольного IgG1 мыши (Biolegend) при 1,5 мг/мл. В День 14 мышей умерщвляли, уши отрезали и затем быстро замораживали в жидком азоте. Эти образцы ткани уха подвергали крионарезанию (6 мкм) и фиксировали в ацетоне в течение 10 минут при КТ. Затем эти высушенные на воздухе криосрезы инкубировали с разведенным 1:400 Alexa Fluor[®] 488-конъюгированным крысиным антителом к Ly-6G мыши (окрашивание GR-1, маркер нейтрофильных гранулоцитов; eBioscience) в течение 1 часа при КТ. После промывки в ФСБ ядра контрастировали с использованием DAPI (Invitrogen) при 1 мкг/мл в течение 5 минут при КТ. Мозаичное сканирование для получения изображения всего уха выполняли с помощью микроскопа Vectra Polaris со следующими настройками: DAPI MSI 0,43 мс, FITC 81,70 мс и 20-кратное увеличение. Окрашивание GR-1 криосрезом анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ/Fiji. Измеряли общую площадь (мкм²) ушей мышей и площадь специфичного окрашивания GR-1 (мкм²). Количественную оценку рассчитывали как площадь GR-1 (мкм²), деленную на общую площадь (мкм²). Для определения соотношения GR-1/общая площадь использовали следующую формулу:

Площадь GR-1 (мкм²)/(Общая площадь (мкм²)/10000(мкм²))

Как показано на Фигуре 31В, очищенное блокирующее CD89/IgA мышиное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 10E7 значительно (P<0,05) ингибировало индуцированный антителом IgA человека к мышиному коллагену XVII приток нейтрофильных гранулоцитов мыши, экспрессирующих CD89 человека, в месте инъекции.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышиное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 10E7 ингибировало экспериментально индуцированный *in vivo* опосредуемый IgA человека приток нейтрофильных гранулоцитов мыши, экспрессирующих CD89 человека, у мышей Tg huCD89/huIgA.

Пример 4. Характеристика эпитопов CD89 человека и доменов CD89 человека, распознаваемых блокирующими CD89/IgA мышиными моноклональными антителами к CD89 человека

(а). Перекрестная конкуренция немеченых блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека с ФЭ-конъюгированным клоном MIP8a (блокатор CD89/IgA), клоном A59 (не блокирует CD89/IgA) и клоном A3 (не блокирует CD89/IgA) коммерческих мышиных антител к CD89 за CD89 человека

Чтобы проанализировать точную специфичность очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека, местоположение эпитопа(ов), распознаваемого созданными блокирующими CD89/IgA мышиными антителами к CD89 человека, определяли путем перекрестной конкуренции с очищенным клоном MIP8a мышиного антитела к CD89 человека, хорошо известным блокатором CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), с очищенным клоном A59 мышиного антитела к CD89 человека, хорошо известным не блокирующим CD89/IgA антителом (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770), и с очищенным клоном A3 мышиного антитела к CD89 человека, хорошо известным не блокирующим CD89/IgA антителом (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770).

CD89 человека состоит из короткого цитоплазматического хвоста, трансмембранной области и двух внеклеточных (EC) Ig-подобных доменов. За счет короткой междоменной шарнирной области эти два Ig-подобных домена EC уложены под углом примерно 90° друг к другу (Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970). Сайт связывания IgA человека на CD89 человека находится в дистальном относительно мембраны Ig-подобном домене EC1 и не находится в проксимальном относительно мембраны Ig-подобном домене EC2 (Wines et al. J Immunol 1999; 162: 2146-2153; Morton J

Exp Med 1999; 189:1715-1722; Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386). Следовательно, общепризнано, что мышинные антитела к CD89 человека, которые связываются с доменом EC1 CD89 человека, могут блокировать связывание IgA человека на CD89 человека, в то время как мышинные антитела к CD89 человека, которые связываются с доменом EC2 CD89 человека, не способны блокировать связывание IgA человека на CD89 человека (Morton et al. Arch Immunol Ther Exp 2001; 49: 217-229; Bakema et al. Immunol Rev 2011; 4: 612-624). Более конкретно, клон MIP8a прототипного блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека распознает эпитоп в пределах домена EC1 CD89 человека (Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386), в то время как клон A59 и клон A3 прототипного не блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека распознают эпитоп в пределах домена EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722) и в пределах границы доменов EC1-EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), соответственно. Способность созданных очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека конкурировать с хорошо известными блокирующими и не блокирующими CD89/IgA мышинными антителами к CD89 (т. е. клоном MIP8a, клоном A59 и клоном A3) на мембранном CD89 человека определяли с помощью FACS-анализа.

Клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл очищенного мышинного антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) анализировали в качестве отрицательного контроля, и 100 мкл очищенного клона MIP8a (BioRad) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3), клона A59 (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) мышинного антитела к CD89 человека анализировали в качестве положительных контролей. После этого (т. е. без промывки) 5 мкл неразведенного ФЭ-конъюгированного клона MIP8a (BioRad), клона A59 (BD Biosciences) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышинного антитела к CD89 человека добавляли к этим клеткам и инкубировали еще 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/ NaN_3 в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) ФЭ-конъюгированного клона MIP8a, клона A59 и клона A3 мышинного антитела к CD89

человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 11А, предварительная инкубация с немеченым очищенным блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 9Н7, 26D6 и 30С7 при 10 мкг/мл полностью (>90%) блокировала последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона М1Р8а коммерческого блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека, в то время как предварительная инкубация с немеченым очищенным блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6 и 20В4 при 10 мкг/мл не блокировала (<25%) последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона М1Р8а коммерческого блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека. В референсных целях предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном М1Р8а блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл также полностью (>90%) блокировала последующее связывание его ФЭ-конъюгированного аналога антитела на мембранном CD89 человека, в то время как предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном А59 и А3 хорошо известного не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл не блокировала (<25%) последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона М1Р8а коммерческого блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека.

Как показано на Фигуре 11В, предварительная инкубация с немеченым очищенным блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 9Н7, 26D6 и 20В4 при 10 мкг/мл частично (\approx 55-65%) блокировала последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А59 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека, в то время как предварительная инкубация с немеченым очищенным блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6 и 30С7 при 10 мкг/мл не блокировала (<25%) последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А59 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека. В референсных целях предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном А59 не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл полностью (>90%) блокировала последующее связывание его ФЭ-конъюгированного аналога антитела на мембранном CD89 человека. Более того, предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном А3 хорошо известного не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл также

полностью (>90%) блокировала последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А59 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека, в то время как предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном М1Р8а хорошо известного блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл частично блокировала (~50%) последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А59 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека.

Как показано на Фигуре 11С, предварительная инкубация с немеченым очищенным блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 9Н7, 26D6 и 20В4 при 10 мкг/мл частично (~55-65%) блокировала последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А3 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека, в то время как предварительная инкубация с немеченым очищенным блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6 и 30С7 при 10 мкг/мл не блокировала (<25%) последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А3 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека. В референсных целях предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном А3 не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл полностью (>90%) блокировала последующее связывание его ФЭ-конъюгированного аналога антитела на мембранном CD89 человека. Более того, предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном А59 хорошо известного не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл также полностью (>90%) блокировала последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А3 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека, в то время как предварительная инкубация с немеченым очищенным клоном М1Р8а хорошо известного блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл частично блокировала (~55%) последующее связывание ФЭ-конъюгированного клона А3 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека.

Чтобы проанализировать степень описанной выше перекрестной конкуренции, предварительную инкубацию с титрованными (в отличие от использования только 10 мкг/мл) перекрестно конкурирующими немечеными очищенными блокирующими CD89/IgA мышинными антителами, специфичными в отношении CD89 человека, также выполняли с последующей инкубацией с ФЭ-конъюгированным клоном М1Р8а, клоном А59 и клоном А3 мышинового антитела к CD89 человека с использованием клеток

HEK293F, стабильно трансфицированных полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше).

Как показано на Фигуре 12A, все перекрестно конкурирующие с «MIP8a» немеченые очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 9H7, 26D6 и 30C7), дозозависимо блокировали связывание ФЭ-конъюгированного клона MIP8a коммерческого блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека. На основании их профиля перекрестной конкуренции с «MIP8a» установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени блокирования «MIP8a-ФЭ»): 9H7=26D6(=MIP8a)>30C7. Обобщенные данные приведены в Таблице 6.

Как показано на Фигуре 12B, все перекрестно конкурирующие с «A59» немеченые очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 9H7, 26D6 и 20B4), дозозависимо блокировали связывание ФЭ-конъюгированного клона A59 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека. На основании их профиля перекрестной конкуренции с «A59» установили следующую очередность (от сильной к более слабой степени блокирования «A59-ФЭ»): (A59=A3)>9H7=26D6=20B4(=MIP8a). Обобщенные данные приведены в Таблице 6.

Как показано на Фигуре 12C, все перекрестно конкурирующие с «A3» немеченые очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 9H7, 26D6 и 20B4), дозозависимо блокировали связывание ФЭ-конъюгированного клона A3 коммерческого не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека на мембранном CD89 человека. На основании их профиля перекрестной конкуренции с «A3» установили следующую очередность (от сильной к более слабой степени блокирования «A3-ФЭ»): (A59=A3)>9H7=26D6=20B4(=MIP8a). Обобщенные данные приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Профили перекрестной конкуренции немеченых очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, с ФЭ-конъюгированным коммерческим клоном MIP8a (блокатор CD89/IgA), клоном A59 (не блокирующее CD89/IgA антитело) и клоном A3 (не блокирующее CD89/IgA антитело) мышинных антител к CD89 на мембранном CD89 человека.

Перекрестная конкуренция

Антитело к CD89	MIP8a-ФЭ	A59-ФЭ	A3-ФЭ
8F3	-	-	-

9H7	++	+	+
10E7	-	-	-
16D6	-	-	-
26D6	++	+	+
20B4	-	+	+
30C7	+ / ++	-	-
Контрольный mIgG1	-	-	-
MIP8a	++	+	+
A59	-	++	++
A3	-	++	++

-= отсутствие блокирования связывания ФЭ-конъюгированного клона MIP8a (блокатор CD89/IgA), клона A59 (не блокирующее CD89/IgA антитело) или клона A3 (не блокирующее CD89/IgA антитело) коммерческого мышиноного антитела к CD89 на мембранном CD89 человека, += слабое блокирование связывания ФЭ-конъюгированного
5 клона MIP8a (блокатор CD89/IgA), клона A59 (не блокирующее CD89/IgA антитело) или клона A3 (не блокирующее CD89/IgA антитело) коммерческого мышиноного антитела к CD89 на мембранном CD89 человека, ++= сильное блокирование связывания ФЭ-конъюгированного клона MIP8a (блокатор CD89/IgA), клона A59 (не блокирующее CD89/IgA антитело) или клона A3 (не блокирующее CD89/IgA антитело) коммерческого
10 мышиноного антитела к CD89 на мембранном CD89 человека.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышиноное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 связывалось с эпитопами CD89 человека, которые отличались от эпитопов CD89 человека, распознаваемых клоном MIP8a, клоном A59 или клоном A3 коммерческого мышиноного
15 антитела к CD89 человека, поскольку их профили перекрестной конкуренции значительно отличались от профилей перекрестной конкуренции, полученных с этими коммерческими мышиноными антителами к CD89 человека. Более того, эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA мышиноное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7 и 16D6 как группа (три антитела с идентичными
20 профилями перекрестной конкуренции) в сравнении с блокирующими CD89/IgA мышиноными антителами, специфичными в отношении CD89 человека, 9H7 и 26B6 как группой (оба антитела с идентичными профилями перекрестной конкуренции) в сравнении с блокирующим CD89/IgA мышиноным антителом, специфичным в отношении

CD89 человека, 20B4 в сравнении с блокирующим CD89/IgA мышинным антителом, специфичным в отношении CD89 человека, 30C7 связывались с неидентичными эпитопами CD89, поскольку их профили перекрестной конкуренции значительно различались. Кроме того, эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 9H7 и 26B6 как группа (оба антитела с идентичными профилями перекрестной конкуренции) в сравнении с клоном MIP8a коммерческого мышинного антитела к CD89 человека, по-видимому, связываются с подобным эпитопом CD89, поскольку их профили перекрестной конкуренции были идентичными. Эти результаты также продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7 и 16D6, по-видимому, связывались со сходным эпитопом CD89, поскольку их профили перекрестной конкуренции были идентичными. Наконец, эти результаты продемонстрировали, что блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 9H7 и 26B6, по-видимому, связывались с подобным эпитопом CD89, поскольку их профили перекрестной конкуренции были идентичными.

(b). Связывание блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с мембранным полноразмерным CD89 человека и различными мембранными химерными конструкциями CD89 человека/бычьего Fc γ 2R (картирование доменов EC1 в сравнении с EC2 CD89 человека)

Чтобы проанализировать точную специфичность очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека, местоположение эпитопа(ов), распознаваемого созданными блокирующими CD89/IgA мышинными антителами к CD89 человека, определяли путем картирования домена. Способность блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека связываться с доменом EC1 или с доменом EC2 CD89 человека, экспрессированного на поверхности клеток HEK293F, определяли с помощью FACS-анализа.

CD89 человека и бычий Fc γ 2R структурно высокогомлогичны и тесно связаны друг с другом (Ravetch et al. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 457-492; Zhang et al. *J Immunol* 1995; 155: 1534-1541). Таким образом, химерные человеческие/бычьи рецепторы конструировали путем обмена Ig-подобных доменов EC1 и EC2 между этими двумя рецепторными белками (см. также Фигуру 13A). Функционально CD89 человека и бычий Fc γ 2R полностью различаются тем, что CD89 человека связывает IgA человека, но не бычий IgG2, в то время как бычий Fc γ 2R связывает бычий IgG2, но не IgA человека. Создавали и временно экспрессировали следующие конструкции CD89 человека: (1) конструкцию мембранного полноразмерного CD89 человека, которая содержала как Ig-

подобный домен EC1, так и Ig-подобный домен EC2 CD89 человека (см. SEQ ID NO: 1), и поэтому обозначена как «EC1-EC2-CD89 человека», (2) конструкцию мембранного химерного Ig-подобного домена EC1 CD89 человека в комбинации с Ig-подобным доменом EC2 бычьего Fcγ2R (см. SEQ ID NO: 3 и NO: 4, т. е. в комбинации с бычьим трансмембранно-внутриклеточным участком или с человеческим трансмембранно-внутриклеточным участком, соответственно), и поэтому обозначенную как «EC1-CD89 человека», и (3) конструкцию мембранного химерного Ig-подобного домена EC1 бычьего Fcγ2R в комбинации с Ig-подобным доменом EC2 CD89 человека (см. SEQ ID NO: 7), и поэтому обозначенную как «EC2-CD89 человека». Кроме того, создавали конструкцию мембранного полноразмерного бычьего Fcγ2R, которая содержала как Ig-подобный домен EC1, так и Ig-подобный домен EC2 бычьего Fcγ2R (см. SEQ ID NO: 9), и поэтому обозначена как «бычий Fcγ2R». кДНК, кодирующие описанные выше конструкции «EC1-EC2-CD89 человека», «EC1-CD89 человека», «EC2-CD89 человека» и «бычьего Fcγ2R», оптимизировали для экспрессии у млекопитающих и синтезировали в компании GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO: 2, NO: 5, NO: 6, NO: 8 и NO: 10, соответственно). Эти кДНК субклонировали в экспрессионные плазмиды, полученные из pсDNA3.1.

Используя экспрессионную систему FreeStyle™ 293 (Invitrogen), клетки FreeStyle™ 293F (Invitrogen) временно трансфицировали конструкциями «CD89 человека», «EC1-CD89 человека», «EC2-CD89 человека» и «бычьего Fcγ2R». Через 48 часов и/или 72 часа связывание блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека с упомянутыми выше химерными человеческими/бычьими рецепторами на трансфицированных клетках анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью временно трансфицированные клетки HEK293F помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл очищенного мышиного антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) анализировали в качестве отрицательного контроля, и 100 мкл при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного клона MIP8a (BioRad), клона A59 (BD Biosciences) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышиного антитела к CD89 человека анализировали в качестве положительных контролей. После тщательной промывки в

ФСБ/БСА/NaN₃ клетки далее инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание антител измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Помимо описанного выше связывания блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с химерными человеческими/бычьими рецепторами на этих временно трансфицированных клетках также исследовали (1) уровни экспрессии на поверхности мембраны и (2) правильную укладку этих химерных человеческих/бычьих рецепторов. Для этого временно трансфицированные клетки НЕК293F помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали (1) со 100 мкл очищенных кроличьих поликлональных антител к CD89 человека (Sino Biological) при 2,5 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) или без них, и (2) со 100 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки; см. Пример 2 (b) выше) (Bethyl Laboratories) при 10 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/NaN₃) или без него в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание (1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и (2) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием разведенных 1:200 FITC-конъюгированных фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении тяжелой/легкой цепей IgG кролика (Jackson ImmunoResearch), и конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C, соответственно. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и (2) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранных химерных человеческих/бычьих рецепторах измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 13B, все химерные рецепторы CD89 человека/бычий Fcγ2R (т. е. два варианта «EC1-CD89 человека» и «EC2-CD89 человека») и полноразмерный CD89 человека экспрессировались на мембранной поверхности временно трансфицированных клеток, о чем свидетельствует связывание кроличьих поликлональных антител к CD89 человека на этих клетках. Кроме того, эти экспрессируемые на мембране химерные рецепторы CD89 человека/бычий Fcγ2R (т. е. два варианта «EC1-CD89 человека») и полноразмерный CD89 человека, по-видимому, демонстрировали надлежащую укладку белка, о чем свидетельствовало связывание как неагрегированного, так и термоагрегированного сывороточного IgA человека. Как и ожидалось, химерный рецептор CD89 человека/бычий Fcγ2R «EC2-CD89 человека», в котором отсутствует домен EC1 (т. е. сайт связывания IgA на CD89 человека), не связывался с неагрегированным и термоагрегированным сывороточным IgA человека. Как и ожидалось, кроличьи поликлональные антитела к CD89 человека и неагрегированный и термоагрегированный сывороточный IgA человека не связывались ни с ложно-трансфицированными клетками, ни с клетками, трансфицированными полноразмерным бычьим Fcγ2R.

Как показано на Фигуре 13C, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7), показали связывание с обоими вариантами «EC1-CD89 человека», но не с «EC2-CD89 человека» на трансфицированных клетках 293F. Более того, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7), показали связывание с клетками, трансфицированными полноразмерным CD89 человека «EC1-EC2-CD89 человека», но не показали связывания ни с ложно-трансфицированными клетками, ни с клетками, трансфицированными полноразмерным бычьим Fcγ2R. Как и ожидалось, очищенный клон MIP8a хорошо известного блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека, который распознает эпитоп в пределах домена EC1 CD89 человека (Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386), показал связывание с обоими вариантами «EC1-CD89 человека», но не с «EC2-CD89 человека», в то время как очищенный клон A59 хорошо известного не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека, который распознает эпитоп в пределах домена EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), показал связывание с «EC2-CD89 человека», но не с «EC1-CD89 человека». Неожиданно, очищенный клон A3 хорошо известного не блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека, который распознает эпитоп, зависящий от частей обоих доменов EC1 и EC2 CD89 человека (Morton J Exp Med 1999; 189:1715-1722), связывался с «EC2-CD89

человека», но не с «EC1-CD89 человека». Наконец, все эти исследованные коммерческие мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, показали связывание с клетками, трансфицированными полноразмерным CD89 человека (EC1-EC2-CD89 человека), но не показали связывания ни с ложно-трансфицированными клетками, ни с клетками, трансфицированными полноразмерным бычьим Fc γ 2R.

Эти результаты продемонстрировали, что все наши блокирующие CD89/IgA мышинные антитела к CD89 человека 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7, по-видимому, распознавали линейные и/или нелинейные/конформационные эпитопы в пределах домена EC1 (т. е. Gln22 – Gly121; Swiss-Prot № P24071.1) полноразмерного CD89 человека.

(с). Связывание блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с мембранным CD89 яванской макаки

Чтобы проанализировать многовидовую перекрестную реактивность наших очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека, способность созданных блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека связываться с полноразмерным CD89 яванской макаки, экспрессированным на поверхности клеток НЕК293F, определяли с помощью FACS-анализа.

кДНК, кодирующую белок CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 11; референсная последовательность NCBI XP_005590398.1) оптимизировали для экспрессии у млекопитающих и синтезировали в компании GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO: 12). Эту кДНК субклонировали в экспрессионную плазмиду, полученную из pcDNA3.1.

Используя экспрессионную систему FreeStyle™ 293 (Invitrogen), клетки FreeStyle™ 293F (Invitrogen) временно трансфицировали полноразмерным CD89 яванской макаки. Через 48 часов и/или 72 часа перекрестную реактивность блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с поверхностным CD89 яванской макаки на трансфицированных клетках анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью временно трансфицированные клетки НЕК293F помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует рецепторы Fc γ ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл очищенного мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве отрицательного контроля, и 100 мкл при 10

мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного клона MIP8a (BioRad), клона A59 (BD Biosciences) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышиногo антитела к CD89 человека анализировали в качестве положительных контролей. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки далее инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание антител измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Помимо описанного выше связывания блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с полноразмерным CD89 яванской макаки на этих временно трансфицированных клетках также исследовали (1) уровни экспрессии на поверхности мембраны и (2) правильную укладку полноразмерного CD89 яванской макаки. Для этого временно трансфицированные клетки НЕК293F помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали (1) со 100 мкл очищенных кроличьих поликлональных антител к CD89 человека (Sino Biological) при 2,5 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) или без них, и (2) со 100 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки; см. Пример 2 (b) выше) (Bethyl Laboratories) при 10 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/NaN₃) или без него в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ связывание (1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и (2) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 яванской макаки определяли с использованием разведенных 1:200 FITC-конъюгированных фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении тяжелой/легкой цепей IgG кролика (Jackson ImmunoResearch), и конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α-цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C, соответственно. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и (2) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на

мембранном CD89 яванской макаки измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

5 Как показано на Фигуре 14А, полноразмерный CD89 яванской макаки экспрессировался на поверхности мембраны временно трансфицированных клеток, о чем свидетельствует связывание перекрестно реагирующих кроличьих поликлональных антител к CD89 человека на этих клетках. Кроме того, этот экспрессированный на мембране полноразмерный CD89 яванской макаки, по-видимому, показывает надлежащую укладку белка, о чем свидетельствует связывание как перекрестно реактивного неагрегированного, так и термоагрегированного сывороточного IgA человека.

10 Как показано на Фигуре 14В, очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека, 16D6 и 30C7 проявляли промежуточную/слабую перекрестную реактивность против полноразмерного CD89 яванской макаки на трансфицированных клетках 293F. Очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела к CD89 человека 8F3, 9H7, 10E7, 26D6 и 20B4 не распознавали полноразмерный CD89 яванской макаки на трансфицированных клетках 293F. Очищенный клон А59 и клон А3 коммерческих мышинных антител к CD89 человека показали сильную перекрестную реактивность против полноразмерного CD89 яванской макаки на трансфицированных клетках 293F, в то время как очищенный клон МР8а коммерческого мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, не показал никакого связывания на полноразмерном CD89 яванской макаки.

Эти результаты продемонстрировали, что мышинные антитела к CD89 человека 16D6 и 30C, по-видимому, распознавали линейные и/или нелинейные/конформационные эпитопы, скорее всего, в домене EC1 полноразмерного CD89 яванской макаки.

25 Предсказанная аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD89 яванской макаки (т. е. Met1 – Lys287; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1) показывает 86% гомологию с аминокислотной последовательностью полноразмерного белка CD89 человека (т. е. Met1 – Lys287; Swiss-Prot № P24071.1), и предсказанная аминокислотная последовательность внеклеточной области CD89 яванской макаки (т. е. Gln22 – Asn227; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1) показывает 83% гомологию с аминокислотной последовательностью внеклеточной области белка CD89 человека (т. е. Gln22-Asn227; Swiss-Prot № P24071.1). Более конкретно, предсказанная аминокислотная последовательность домена EC1 (т. е. Gln22 – Gly121; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1), короткой шарнирной области (т. е. Leu122 – Lys125), домена EC2 (т. е. Pro126 – Asn220) и проксимальной

относительно мембраны «линкерной» области (т. е. Arg221 – Asn227) белка CD89 яванской макаки показывает 72%, 100%, 93% и 85% гомологию с аминокислотной последовательностью их соответствующих аналогов белка CD89 человека, соответственно.

5 Учитывая, что созданные нами блокирующие CD89/IgA мышиные антитела к CD89 человека 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7, по-видимому, распознают линейные и/или нелинейные/конформационные эпитопы в пределах домена EC1 (т. е. Gln22-Gly121; Swiss-Prot № P24071.1) полноразмерного CD89 человека (см. Пример 4 (b) выше), неудивительно, что большинство наших блокирующих CD89/IgA мышиных антител к
10 CD89 человека (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 26D6 и 20B4) не реагировали перекрестно с низкогомологичным (т. е. 72% по аминокислотной последовательности) доменом EC1 (т. е. Gln22 – Gly121; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1) полноразмерного CD89 яванской макаки на трансфицированных клетках 293F.

(d). Связывание блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека с
15 различными мембранными химерными конструкциями CD89 человека/CD89 яванской макаки (картирование эпитопов в пределах домена EC1 CD89 человека)

Чтобы проанализировать точную специфичность очищенных блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека, эпитоп(ы), распознаваемый созданными блокирующими CD89/IgA мышиными антителами к CD89 человека, определяли путем
20 картирования эпитопов. Способность блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека связываться с эпитопами в пределах домена EC1 CD89 человека, экспрессированного на поверхности клеток НЕК293F, определяли с помощью FACS-анализа.

Полноразмерный CD89 человека и полноразмерный CD89 яванской макаки
25 структурно высокогомологичны (т. е. по аминокислотной последовательности; см. также Пример 4 (c) выше) и тесно связаны друг с другом (Rogers et al. Immunol 2004; 113: 178-186). Однако созданные нами блокирующие CD89/IgA мышиные антитела к CD89 человека, которые все распознавали эпитопы с доменом EC1 CD89 человека (см. Пример 4 (b) выше), либо не показали (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 26D6 и 20B4), либо показали слабую
30 (т. е. 30C7) или промежуточную (т. е. 16D6) межвидовую реактивность с доменом EC1 CD89 яванской макаки (см. Пример 4 (c) выше). Таким образом, химерные рецепторы CD89 человека/CD89 яванской макаки конструировали путем замены частей (т. е. пептидов длиной 25 аминокислот) из домена EC1 CD89 человека реципрокными аналогами из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. также Фигуру 15A) для определения
35 критических областей в пределах домена EC1 CD89 человека, которые распознаются

созданными нами блокирующими CD89/IgA мышиными антителами к CD89. Функционально CD89 человека и CD89 яванской макаки сходны в том, что как CD89 человека, так и CD89 яванской макаки связывают сывороточный IgA человека (см. Пример 4 (с) выше). Создавали и временно экспрессировали следующие конструкции CD89 человека: (1) конструкцию мембранного полноразмерного CD89 человека, которая содержала полноразмерный домен EC1 CD89 человека (см. SEQ ID NO: 1), и поэтому была обозначена «EC1-CD89 человека», (2) конструкцию мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки (I), состоящую из Gln22 – Lys46 из домена EC1 CD89 человека, замененных реципрокными Gln22 – Arg46 из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 13), и поэтому обозначенную «ΔGln22 – Lys46 EC1-CD89 человека», (3) конструкцию мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки (II), состоящую из Ile47 – Ile71 из домена EC1 CD89 человека, замененных реципрокными Ile47 – Arg71 из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 15), и поэтому обозначенную «ΔIle47 – Ile71 EC1-CD89 человека», (4) конструкцию мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки (III), состоящую из Gly72 – Gly96 из домена EC1 CD89 человека, замененных реципрокными Asp72 – Gly96 из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 17), и поэтому обозначенную «ΔGly72 – Gly96 EC1-CD89 человека», и (5) конструкцию мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки (IV), состоящую из Arg97 – Gly121 из домена EC1 CD89 человека, замененных реципрокными Arg97 – Gly121 из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 19), и поэтому обозначенную «ΔArg97 – Gly121 EC1-CD89 человека». Кроме того, конструкцию мембранного полноразмерного CD89 яванской макаки, которая содержала полноразмерный домен EC1 CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 11), и поэтому была обозначена «EC1-CD89 яванской макаки».

В дополнение к обмену частями домена EC1 последовательных пептидов из 25 аминокислот в длину (т. е. конструкции I-IV, см. выше) контактирующие с IgA человека аминокислотные остатки (горячие точки) на CD89 человека (в соответствии с Herr et al, Nature 2003; 423: 614-620; Vakema et al. Immunol Rev 2011; 4: 612-624; Lu et al. Protein Sci 2014; 23: 378-386) также обменивали на реципрокные аминокислоты из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. также Фигуру 15A). С этой целью создавали и временно экспрессировали следующую химерную конструкцию CD89 человека/CD89 яванской макаки: конструкцию мембранного химерного CD89 человека/яванской макаки CD89, состоящую из Thr58, Gln59, Arg73, Arg74, Lys76, His106 и Tyr107 из домена EC1 CD89 человека, замененных реципрокными Ile58, Trp59, Glu73, Lys74, Gly76, Leu106 и Ser107 из домена EC1 CD89 яванской макаки (см. SEQ ID NO: 21), и поэтому обозначенную

«ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки).

кДНК, кодирующие описанные выше конструкции «EC1-CD89 человека», «ΔGln22 – Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔIle47 – Ile71 EC1-CD89 человека», «ΔGly72 – Gly96 EC1-CD89 человека», «ΔArg97 – Gly121 EC1-CD89 человека», «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки) и «EC1-CD89 яванской макаки» оптимизировали для экспрессии у млекопитающих и синтезировали в GENEART, Регенсбург, Германия (см. SEQ ID NO: 2, NO: 14, NO: 16, NO: 18, NO: 20, NO: 22 и NO: 12, соответственно). Эти кДНК субклонировали в экспрессионные плазмиды, полученные из pcDNA3.1.

Используя экспрессионную систему FreeStyle™ 293 (Invitrogen), клетки FreeStyle™ 293F (Invitrogen) временно трансфицировали конструкциями «EC1-CD89 человека», «ΔGln22 – Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔIle47 – Ile71 EC1-CD89 человека», «ΔGly72 – Gly96 EC1-CD89 человека», «ΔArg97 – Gly121 EC1-CD89 человека», «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки) и «EC1-CD89 яванской макаки». Через 48 часов связывание блокирующих CD89/IgA мышиных антител к CD89 человека с упомянутыми выше химерными конструкциями CD89 человека/CD89 яванской макаки на трансфицированных клетках анализировали с помощью FACS-анализа. С этой целью временно трансфицированные клетки HEK293F помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл очищенного мышинового антитела к CD89 человека при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл очищенного изотипического контрольного IgG1 мыши (BD Biosciences) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) анализировали в качестве отрицательного контроля, и 100 мкл при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного клона MIP8a (BioRad), клона A59 (BD Biosciences) и клона A3 (Santa Cruz Biotechnology) мышинового антитела к CD89 человека анализировали в качестве положительных контролей. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки далее инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козыми антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C.

Связывание антител измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Помимо описанного выше связывания блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека с химерными конструкциями CD89 человека/CD89 яванской макаки на этих временно трансфицированных клетках также исследовали (1) уровни экспрессии на поверхности мембраны и (2) правильную укладку этих химерных конструкций CD89 человека/CD89 яванской макаки. Для этого временно трансфицированные клетки НЕК293F помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует рецепторы Fc γ ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали (1) со 100 мкл очищенных кроличьих поликлональных антител к CD89 человека (Sino Biological) при 2,5 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) или без них, и (2) со 100 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного IgA человека (полученного из сыворотки; см. Пример 2 (b) выше) (Bethyl Laboratories) при 10 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) или без него в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 связывание (1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и (2) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием разведенных 1:200 FITC-конъюгированных фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении тяжелой/легкой цепей IgG кролика (Jackson ImmunoResearch), и конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')₂ козьих антител, специфичных в отношении α -цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C, соответственно. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/ NaN_3 в течение 30 минут при 4°C. Связывание (1) кроличьих поликлональных антител к CD89 человека и (2) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на конструкциях мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки измеряли с использованием проточного цитометра (модель FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 15B, все химерные конструкции CD89 человека/CD89 яванской макаки (т. е. « Δ Gln22 – Lys46 EC1-CD89 человека», « Δ Ile47 – Ile71 EC1-CD89 человека», « Δ Gly72 – Gly96 EC1-CD89 человека», « Δ Arg97 – Gly121 EC1-CD89 человека» и « Δ Thr58, Gln59; Δ Arg73, Arg74, Lys76; Δ His106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие

точки)), а также полноразмерный CD89 человека и полноразмерный CD89 яванской макаки экспрессировались на мембранной поверхности временно трансфицированных клеток, о чем свидетельствовало связывание поликлональных кроличьих антител к CD89 человека на этих клетках. Кроме того, экспрессированные на мембране химерные конструкции CD89 человека/CD89 яванской макаки «ΔGln22 – Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔGly72 – Gly96 EC1-CD89 человека» и «ΔArg97 – Gly121 EC1-CD89 человека», а также полноразмерный CD89 человека и полноразмерный CD89 яванской макаки связывались как с неагрегированным, так и с термоагрегированным сывороточным IgA человека. Напротив, экспрессированные на мембране химерные конструкции CD89 человека/CD89 яванской макаки «ΔIle47 – Ile71 EC1-CD89 человека» и «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки) не показали какого-либо связывания с неагрегированным и термоагрегированным сывороточным IgA человека.

Эти результаты продемонстрировали, что сывороточный IgA человека связывался с аминокислотной последовательностью Ile47-Ile71 (т. е. IQCQAIREAYLTQLMIIKNSTYREI; см. SEQ ID NO: 24) в пределах домена EC1 CD89 человека, и что аминокислотные остатки Thr58 и Gln59 в пределах этой аминокислотной последовательности Ile47-Ile71, по видимому, являются критическими для этого взаимодействия сывороточного IgA человека/CD89 человека, поскольку сывороточный IgA человека не связывался с «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15C и как ожидалось (см. Пример 4 (с) выше), все наши очищенные блокирующие CD89/IgA мышинные антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7) показали сильное связывание с полноразмерным CD89 человека, но не показали связывания (т. е. 8F3, 9H7, 10E7, 26D6 и 20B4), показали слабое (т. е. 30C7) или промежуточное (т. е. 16D6) связывание с полноразмерным CD89 яванской макаки. Как и ожидалось (см. Пример 4 (с) выше), клон MIP8a коммерческого мышинного антитела к CD89 человека также показал сильное связывание с полноразмерным CD89 человека, но не связывался с полноразмерным CD89 яванской макаки. Как и ожидалось (см. Пример 4 (с) выше), клон A59 и клон A3 коммерческого мышинного антитела к CD89 человека показали сильное связывание как с полноразмерным CD89 человека, так и с полноразмерным CD89 яванской макаки. Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15C, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3 показало сильное связывание с

«ΔGln22-Lys46 EC1-CD89 человека» и «ΔArg97-Gly121 EC1-CD89 человека», но показало промежуточное связывание или отсутствие связывания с конструкциями «ΔIle47-Ile71 EC1-CD89 человека» и «ΔGly72-Gly96 EC1-CD89 человека», соответственно, это указывает на то, что мышинное антитело к CD89 человека 8F3 распознавало линейный или
5 нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотных последовательностях Ile47 – Ile71 и Gly72 – Gly96 в пределах домена EC1 (т. е. IQCQAIREAYLTQLMIIKNSTYREI и GRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAG, соответственно; см. SEQ ID NO: 24 и 25) CD89 человека. Аминокислотные остатки Thr58, Gln59, Arg73, Arg74 и Lys76 в пределах этих аминокислотных последовательностей Ile47-Ile71 и Gly72-Gly96, по-видимому, являются
10 критическими для связывания мышинного антитела к CD89 человека 8F3 с CD89 человека, поскольку мышинное антитело к CD89 человека 8F3 не показало связывания с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное
15 антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 9H7 показало сильное связывание с конструкциями «ΔGln22– Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔIle47– Ile71 EC1-CD89 человека» и «ΔGly72– Gly96 EC1-CD89 человека», но показало слабое связывание с «ΔArg97–Gly121 EC1-CD89 человека», это указывает на то, что мышинное антитело к CD89 человека 9H7 распознавало линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотной
20 последовательности Arg97– Gly121 (т. е. RYQCQYRIGHYRFRYSDTLELVVTG; см. SEQ ID NO: 26) в пределах домена EC1 CD89 человека. Аминокислотные остатки His106 и Tyr107 в пределах этой аминокислотной последовательности Arg97–Gly121, по-видимому, являются критическими для связывания мышинного антитела к CD89 человека 9H7 с CD89 человека, поскольку мышинное антитело к CD89 человека 9H7 показало слабое связывание
25 с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 10E7 показало сильное связывание с конструкциями «ΔGln22–Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔIle47–Ile71 EC1-CD89 человека»
30 и «ΔArg97-Gly121 EC1-CD89 человека», но показало слабое связывание с конструкцией «ΔGly72-Gly96 EC1-CD89 человека», это указывает на то, что мышинное антитело к CD89 человека 10E7 распознавало линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотной последовательности Gly72–Gly96 (т. е. GRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAG; см. SEQ ID NO: 25) в пределах домена EC1 CD89

человека. Аминокислотные остатки Arg73, Arg74 и Lys76 в пределах этой аминокислотной последовательности Gly72–Gly96 оказались критическими для связывания мышинового антитела к CD89 человека 10E7 с CD89 человека, поскольку мышиноое антитело к CD89 человека 10E7 не показало связывания с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышиноое антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 16D6 показало сильное связывание с «ΔGln22-Lys46 EC1-CD89 человека» и «ΔArg97-Gly121 EC1-CD89 человека», но показало слабое или промежуточное связывание с конструкциями «ΔIle47-Ile71 EC1-CD89 человека» и «ΔGly72-Gly96 EC1-CD89 человека», соответственно, это указывает на то, что мышиноое антитело к CD89 человека 16D6 распознавало линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотных последовательностях Ile47–Ile71 и Gly72–Gly96 в пределах домена EC1 (т. е. IQCQAIREAYLTQLMIIKNSTYREI и GRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAG, соответственно; см. SEQ ID NO: 24 и 25) CD89 человека. Аминокислотные остатки Thr58, Gln59, Arg73, Arg74 и Lys76 в пределах этих аминокислотных последовательностей Ile47-Ile71 и Gly72-Gly96 оказались критическими для связывания мышинового антитела к CD89 человека 16D6 с CD89 человека, поскольку мышиноое антитело к CD89 человека 16D6 не показало связывания с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышиноое антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 26D6 показало сильное связывание с конструкциями «ΔGln22–Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔIle47–Ile71 EC1-CD89 человека» и «ΔGly72–Gly96 EC1-CD89 человека», но показало слабое связывание с «ΔArg97–Gly121 EC1-CD89 человека», это указывает на то, что мышиноое антитело к CD89 человека 26D6 распознавало линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотной последовательности Arg97–Gly121 (т. е. RYQCQYRIGHYFRYSDTLELVVTG; см. SEQ ID NO: 26) в пределах домена EC1 CD89 человека. Аминокислотные остатки His106 и Tyr107 в пределах этой аминокислотной последовательности Arg97–Gly121 оказались критическими для связывания мышинового антитела к CD89 человека 26D6 с CD89 человека, поскольку мышиноое антитело к CD89 человека 26D6 показало промежуточное связывание с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 20В4 показало сильное связывание с конструкциями «ΔGly72-Gly96 EC1-CD89 человека» и «ΔArg97-Gly121 EC1-CD89 человека», но показало промежуточное связывание или отсутствие связывания с конструкциями «ΔGln22-Lys46 EC1-CD89 человека» и «ΔIle47-Ile71 EC1-CD89 человека», соответственно, это указывает на то, что мышинное антитело к CD89 человека 20В4 распознавало линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотных последовательностях Gln22-Lys46 и Ile47-Ile71 в пределах домена EC1 (т. е. QEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVK и IQCQAIREAYLTQLMIKNSTYREI, соответственно; см. SEQ ID NO: 23 и 24) CD89 человека. Аминокислотные остатки Thr58 и Gln59 в пределах аминокислотной последовательности Ile47-Ile71 оказались не критическими для связывания мышинного антитела к CD89 человека 20В4 с CD89 человека, поскольку мышинное антитело к CD89 человека 20В4 показало сильное связывание с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, наше очищенное блокирующее CD89/IgA мышинное антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 30С7 показало сильное связывание с конструкциями «ΔGln22-Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔGly72-Gly96 EC1-CD89 человека» и «ΔArg97-Gly121 EC1-CD89 человека», но не показало связывания с конструкцией «ΔIle47-Ile71 EC1-CD89 человека», это указывает на то, что мышинное антитело к CD89 человека 30С7 распознавало линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотной последовательности Ile47-Ile71 в пределах домена EC1 (т. е. IQCQAIREAYLTQLMIKNSTYREI, соответственно; см. SEQ ID NO: 24) CD89 человека. Аминокислотные остатки Thr58 и Gln59 в пределах этой аминокислотной последовательности Ile47-Ile71 оказались не критическими для связывания мышинного антитела к CD89 человека 30С7 с CD89 человека, поскольку мышинное антитело к CD89 человека 30С7 показало сильное связывание с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Как показано на Фигуре 15С, очищенный клон М1Р8а хорошо известного блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека показал сильное связывание с конструкциями «ΔGln22-Lys46 EC1-CD89 человека», «ΔIle47-Ile71 EC1-CD89 человека» и «ΔGly72-Gly96 EC1-CD89 человека», но не показал связывания с конструкцией «ΔArg97-Gly121 EC1-CD89 человека», это указывает на то, что клон М1Р8а

мышинного антитела к CD89 человека распознавал линейный или нелинейный/конформационный эпитоп в аминокислотной последовательности Arg97–Gly121 (т. е. RYQCQYRIGHYRFYSDTLELVVTG; см. SEQ ID NO: 26) в пределах домена EC1 CD89 человека. Аминокислотные остатки His106 и Tyr107 в пределах этой

5 аминокислотной последовательности Arg97–Gly121 оказались критическими для связывания клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека с CD89 человека, поскольку клон MIP8a мышинного антитела к CD89 человека показал промежуточное связывание с конструкцией «ΔThr58, Gln59; ΔArg73, Arg74, Lys76; ΔHis106, Tyr107 EC1-CD89 человека» (горячие точки). Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

10 Как показано на Фигуре 15C и как ожидалось, очищенные хорошо известные не блокирующие CD89/IgA мышинные антитела к CD89 человека, клон A59 и клон A3, которые оба распознают эпитопы в пределах домена EC2 CD89 человека (см. Пример 4 (b) выше), показали сильное связывание со всеми исследованными химерными

15 конструкциями CD89 человека/CD89 яванской макаки, поскольку ни в одной из этих конструкций домен EC2 человека не был изменен. Обобщенные данные приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Связывание очищенных блокирующих CD89/IgA мышинных антител, специфичных в отношении CD89 человека, и сывороточного IgA человека с мембраносвязанными химерными конструкциями CD89 человека/CD89 яванской макаки

20 на клетках НЕК.

Связывание мышинных антител к CD89 человека и IgA человека с химерными конструкциями CD89 человека/CD89 яванской макаки

Антитело к CD89	huCD89	CD89 человека заменен частями EC1 из CD89 яванской макаки					Горячие точки	CD89 яванской макаки
		I (22-46)	II (47-71)	III (72-96)	IV (97-121)			
8F3	++	++	+	-	++	-	-	
9H7	++	++	++	++	-/+	-/+	-	
10E7	++	++	++	-/+	++	-	-	
16D6	++	++	-/+	+	++	-	+	
26D6	++	++	++	++	-/+	+	-	
20B4	++	+	-	++	++	++	-	
30C7	++	++	-	++	++	++	-/+	

МIP8a	++	++	++	++	-	+	-
A59	++	++	++	++	++	++	++
A3	++	++	++	++	++	++	++
huIgA	++	++	-	++	++	-	++

-= отсутствие связывания мышиных антител к CD89 или IgA человека с конструкциями мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки, -/+ = слабое связывание мышиных антител к CD89 или IgA человека с конструкциями мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки, += промежуточное связывание мышиных антител к CD89 или IgA человека с конструкциями мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки, ++ = сильное связывание мышиных антител к CD89 или IgA человека с конструкциями мембранного химерного CD89 человека/CD89 яванской макаки.

Пример 5. Молекулярно-генетическая характеристика блокирующих CD89/IgA мышиных моноклональных антител к CD89 человека

Клетки гибридомы, продуцирующие блокирующее CD89/IgA мышиное антитело к CD89 человека 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7, промывали ФСБ и делили на аликвоты в микропробирки, содержащие 5×10^6 клеток, и хранили в виде осадков при -80°C . Эти осадки клеток использовали для выделения РНК с помощью мининабора для выделения RNeasy (QIAGEN). Определяли концентрацию РНК (A260 нм), РНК хранили при -80°C . кДНК синтезировали из 2 мкг РНК с помощью обратной транскриптазы, используя набор для синтеза кДНК RevertAidTM H Minus First Strand cDNA (Fermentas) и хранили при -80°C . На основе изоформа мышиного IgG1/каппа конструировали праймеры, показанные в Таблице 8, для амплификации переменных (V) областей мышиного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7.

Таблица 8. Праймеры для ПЦР, использованные для амплификации кДНК мышиного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3, 9H7, 10E7, 16D6, 26D6, 20B4 и 30C7.

№*	Последовательность	Смысловой/антисмысловой	Ген
385	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGT TG (SEQ ID NO: 103)	смысловой	VL
386	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGM WTCTTG (SEQ ID NO: 104)	смысловой	VL

387	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGC TTC (SEQ ID NO: 105)	смысловой	VL
389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA (SEQ ID NO: 106)	смысловой	VL
391	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG (SEQ ID NO: 107)	смысловой	VL
394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO: 108)	антисмысловой	Ск
405	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT (SEQ ID NO: 109)	смысловой	VH
407	ATGRAC TTTGGGYTCAGCTTGR TTT (SEQ ID NO: 110)	смысловой	VH
409	ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTCTTCTGC (SEQ ID NO: 111)	смысловой	VH
410	ATGGRATGGAGCKGGGTCTTTMTCTT (SEQ ID NO: 112)	смысловой	VH
412	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCT (SEQ ID NO: 113)	смысловой	VH
416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG (SEQ ID NO: 114)	антисмысловой	СН
605	AAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO: 115)	антисмысловой	Ск
609	GASRTHSTGATGACCCAGACNCC (SEQ ID NO: 116)	смысловой	VL

см.=смысловой; антисм.=антисмысловой; VL=вариабельная область легкой цепи; VH=вариабельная область тяжелой цепи; Ск=константная каппа (κ) область легкой цепи; СН=константная область тяжелой цепи IgG1; *Нумерация согласно внутренней системе кодирования Bioscog BV; вырожденные праймеры: K=G или T, S=G или C, R=A или G, M=A или C, W=A или T, Y=C или T, H=A или C или T, и N=любое основание.

5 Праймеры 385, 386, 387, 389 и 391 представляют собой смысловые праймеры, сконструированные для ренатурации с сигнальным пептидом легкой цепи мышинового антитела; праймеры 394 и 605 представляют собой антисмысловые праймеры, ренатурирующие с константной областью мышины к легкой цепи. Праймер 609
10 представляет собой вырожденный праймер, ренатурирующий с мышиним каркасом 1 (FR1) мышины области VL. Праймеры 405, 407, 409, 410 и 412 представляют собой

смысловые праймеры, ренатурирующие с сигнальным пептидом тяжелой цепи мышиноного антитела; праймер 416 представляет собой антисмысловой праймер, сконструированный для ренатурации с константной областью тяжелой цепи IgG1. Проводили различные ПЦР с использованием комбинаций праймеров, показанных в Таблице 8. Созданные продукты ПЦР субклонировали в вектор pCR™-Blunt II-TOPO®. Впоследствии клонированные вставки секвенировали.

Всего получили 4 и 5 информативных последовательностей из реакций последовательностей тяжелой и легкой цепей, соответственно, для блокирующего CD89/IgA мышиноного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 8F3, которые представлены в SEQ ID NO: 27 и 28, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 8F3 представлены в SEQ ID NO: 29-31 и 32-34, соответственно.

Всего получили 4 информативные последовательности из реакций последовательностей как тяжелой, так и легкой цепей для блокирующего CD89/IgA мышиноного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 9H7. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 9H7, которые представлены в SEQ ID NO: 35 и 36, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 9H7 представлены в SEQ ID NO: 37-39 и 40-42, соответственно.

Всего получили 4 информативные последовательности из реакций последовательностей как тяжелой, так и легкой цепей для блокирующего CD89/IgA мышиноного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 10E7. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 10E7, которые представлены в SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 10E7 представлены в SEQ ID NO: 45-47 и 48-50, соответственно.

Всего получили 4 информативные последовательности из реакций последовательностей как тяжелой, так и легкой цепей для блокирующего CD89/IgA мышиноного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 16D6. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышиноного антитела к CD89 человека 16D6, которые представлены в SEQ ID NO: 51

и 52, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 16D6 представлены в SEQ ID NO: 53-55 и 56-58, соответственно.

5 Всего получили 4 информативные последовательности из реакций последовательностей как тяжелой, так и легкой цепей для блокирующего CD89/IgA мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 26D6. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 26D6, которые представлены в SEQ ID NO: 59 и 60, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 26D6 представлены в SEQ ID NO: 61-63 и 64-66, соответственно.

15 Всего получили 4 и 6 информативных последовательностей из реакций последовательностей тяжелой и легкой цепей, соответственно, для блокирующего CD89/IgA мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 20B4. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 20B4, которые представлены в SEQ ID NO: 67 и 68, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 20B4 представлены в SEQ ID NO: 69-71 и 72-74, соответственно.

20 Всего получили 4 информативные последовательности из реакций последовательностей как тяжелой, так и легкой цепей для блокирующего CD89/IgA мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 30C7. На основании этой информации определяли консенсусные аминокислотные последовательности областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 30C7, которые представлены в SEQ ID NO: 75 и 76, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR областей VH и VL мышинового антитела к CD89 человека 30C7 представлены в SEQ ID NO: 77-79 и 80-82, соответственно.

Пример 6. Создание блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих IgG4/каппа (т. е. замена мышинных константных доменов IgG1/каппа человеческими константными доменами IgG4/каппа) моноклональных антител к CD89 человека

30 На основе определенных мышинных V-областей (см. Пример 5 выше) блокирующих CD89/IgA мышинных антител к CD89 человека получили конструкцию для создания вариантов блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека. С этой целью последовательности кДНК, оптимизированные для *Cricetulus griseus*, SEQ ID NO: 83 (кодирует химерную мышинную/человеческую тяжелую цепь IgG4

8F3), NO: 84 (кодирует химерную мышиную/человеческую тяжелую цепь IgG4 10E7), NO: 85 (кодирует химерную мышиную/человеческую тяжелую цепь IgG4 16D6), NO: 86 (кодирует химерную мышиную/человеческую тяжелую цепь IgG4 20B4) и NO: 87 (кодирует химерную мышиную/человеческую тяжелую цепь IgG4 30C7) и SEQ ID NO: 88
5 (кодирует химерную мышиную/человеческую легкую к-цепь 8F3), NO: 89 (кодирует химерную мышиную/человеческую легкую к-цепь 10E7), NO: 90 (кодирует химерную мышиную/человеческую легкую к-цепь 16D6), NO: 91 (кодирует химерную мышиную/человеческую легкую к-цепь 20B4) и NO: 92 (кодирует химерную мышиную/человеческую легкую к-цепь 30C7) заказывали в GENEART (Регенсбург,
10 Германия), которые кодировали сигнальный пептид человека, за которым следовала либо мышинная цепь VH, связанная с человеческой стабилизированной (т. е. S239P; в соответствии с Angal et al in Mol. Immunol., Vol. 30, No. 1, pp. 105-108, 1993) константной областью IgG4, либо за которым следовала мышинная цепь VL, связанная с человеческой константной областью каппа. Используя подходящие рестрикционные ферменты,
15 созданные кДНК субклонировали в экспрессионные плазмиды, полученные из pcDNA3.1. Затем химерные антитела временно экспрессировали в клетках 293-F (Invitrogen) с использованием системы экспрессии FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Экспрессированные блокирующие CD89/IgA химерные антитела к CD89 человека очищали из супернатантов с использованием обычных колонок для аффинной хроматографии с белком А. После этого
20 уровни ЛПС определяли с использованием LAL-хромогенного анализа по конечной точке (Nycult Biotech), и все наши очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7) содержали <0,001 ЕЭ ЛПС/мкг химерного IgG.

Химерные аминокислотные последовательности см. в SEQ ID NO: 93 (химерная
25 мышинная/человеческая тяжелая цепь IgG4 8F3), SEQ ID NO: 94 (химерная мышинная/человеческая тяжелая цепь IgG4 10E7), SEQ ID NO: 95 (химерная мышинная/человеческая тяжелая цепь IgG4 16D6), SEQ ID NO: 96 (химерная мышинная/человеческая тяжелая цепь IgG4 20B4), SEQ ID NO: 97 (химерная мышинная/человеческая тяжелая цепь IgG4 30C7), SEQ ID NO: 98 (химерная
30 мышинная/человеческая легкая к-цепь 8F3), SEQ ID NO: 99 (химерная мышинная/человеческая легкая к-цепь 10E7), SEQ ID NO: 100 (химерная мышинная/человеческая легкая к-цепь 16D6), SEQ ID NO: 101 (химерная мышинная/человеческая легкая к-цепь 20B4) и SEQ ID NO: 102 (химерная мышинная/человеческая легкая к-цепь 30C7).

Пример 7. Характеристика связывания блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека

(а). Относительная аффинность связывания блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека в отношении CD89 человека

5 Для определения относительной аффинности связывания очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека в отношении CD89 человека использовали ИФА и FACS-анализ.

ИФА: rhuCD89 (Sino Biological) наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ (25 нг/50 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов для ИФА с половинным 10 объемом (Corning) в течение 16-24 часов при 4–8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% БСА (Roche) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали с 50 мкл титрованного (в блокирующем буфере) очищенного химерного мышиного/человеческого антитела к CD89 человека и без него в течение 1 часа при КТ. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% 15 Tween 20 связывание антител на rhuCD89 определяли с использованием разведенных 1:5000 конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) козьих антител, специфичных в отношении Fcγ IgG человека (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при КТ, а затем добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М H₂SO₄ связывание 20 (оптическую плотность) антител на rhuCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (iMark; BioRad). Для сравнения аналоги мышиного антитела к CD89 человека анализировали параллельно, и их связывание отслеживали, как описано в Примере 2 (а).

25 FACS: клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток 30 инкубировали с 100 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного химерного мышиного/человеческого антитела к CD89 человека/пробирку или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали 100 мкл очищенного изотипического контрольного антитела IgG4 человека (опдиво (Opdivo®); Bristol-Myers Squibb) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА/NaN₃). После тщательной 35 промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-

конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fcγ IgG человека (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences). Для сравнения аналоги мышиного антитела к CD89 человека анализировали параллельно, и их связывание отслеживали, как описано в Примере 2 (а).

Как показано на Фигуре 16А, все очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышиные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо связывались с μ CD89. На основании их профиля связывания установили следующую очередность по относительной аффинности (от высокой к более низкой аффинности): 20B4>8F3=10E7=30C7>16D6. Для сравнения и в соответствии с данными, аналогичные мышиные антитела к CD89 человека показали сходную очередность по относительной аффинности, т. е. 20B4>8F3=10E7=30C7>16D6. Более конкретно, химерное мышиное/человеческое антитело к CD89 человека 20B4, 8F3, 10E7, 30C7 и 16D6 приводило к следующей относительной аффинности (т. е. полумаксимальному связыванию ЭК₅₀) 9, 31, 16, 22 и 108 нг/мл, соответственно, в то время как соответствующие мышиные антитела к CD89 человека 20B4, 8F3, 10E7, 30C7 и 16D6 приводили к относительной аффинности 13, 52, 20, 29 и 119 нг/мл, соответственно, это указывает на то, что аффинность связывания химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека 20B4, 8F3, 10E7, 30C7 и 16D6 против μ CD89, по-видимому, остается неизменной в процессе химеризации.

Как показано на Фигуре 16В, все очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышиные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо связывались с мембранным CD89 человека. На основании их профиля связывания установили следующую очередность по относительной аффинности (от высокой к более низкой аффинности): 20B4>30C7>8F3=10E7>16D6. Для сравнения, аналогичные мышиные антитела к CD89 человека показали несколько иную очередность по относительной аффинности, т. е. 20B4>8F3=10E7=30C7>16D6. Более конкретно, химерное мышиное/человеческое антитело к CD89 человека 20B4, 8F3, 10E7, 30C7 и 16D6 приводило к следующей относительной аффинности (т. е. полумаксимальному связыванию ЭК₅₀) 296, 1321, 1251, 615 и 1789 нг/мл, соответственно, в то время как соответствующие мышиные антитела к CD89 человека 20B4, 8F3, 10E7, 30C7 и 16D6 приводили к относительной аффинности 260, 714, 637, 484 и 1622 нг/мл, соответственно,

это указывает на то, что (1) аффинность связывания химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека 20B4, 30C7 и 16D6 против мембраносвязанного CD89, по-видимому, оставалась неизменной в процессе химеризации, и (2) аффинность связывания химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека 8F3 и 10E7 против мембраносвязанного CD89, по-видимому, несколько уменьшалась в процессе химеризации.

(b). Степень CD89/IgA-блокирующей способности блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать степень блокирования CD89/IgA очищенных химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека, способность очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека стерически препятствовать взаимодействию сывороточного IgA человека с CD89 человека определяли с помощью FACS-анализа.

Клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы $\text{Fc}\gamma$; Sigma), на 10 минут при 4°C . Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного химерного мышиноного/человеческого антитела к CD89 человека/пробирку в течение 30 минут при 4°C . Одновременно с этим 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного клона MIP8a мышиноного антитела к CD89 человека (хорошо известного блокатора CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), BioRad) анализировали в качестве положительного контроля. Кроме того, 50 мкл очищенного клона A59 мышиноного антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); BD Biosciences) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) и 50 мкл очищенного клона A3 мышиноного антитела к CD89 человека (хорошо известного не блокирующего CD89/IgA антитела (Monteiro et al. J Immunol 1992; 148: 1764-1770); Santa Cruz Biotechnology) при 20 мкг/мл (в ФСБ/БСА/ NaN_3) анализировали в качестве отрицательных контролей. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного неагрегированного или термоагрегированного (см. Пример 2 (b) выше) IgA человека (полученного из сыворотки) (Bethyl Laboratories) при 20 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) и инкубировали еще 30 минут при 4°C . После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 связывание сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')_2 козьих

антител, специфичных в отношении α -цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) неагрегированного или термоагрегированного сывороточного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

10 Как показано на Фигурах 17A и 17B, все очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышиные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо предотвращали связывание неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека. На основании их профиля блокирования CD89/IgA установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени блокирования CD89/IgA): 20B4>30C7>8F3=10E7>16D6. Интересно, что, по-видимому, существовала сильная положительная взаимосвязь между степенью стерического блокирования связывания сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека (этот пример) этих исследованных химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека и их соответствующей относительной аффинностью связывания в отношении мембранного CD89 человека (см. Пример 7 (а) выше). В референсных целях клон MIP8a мышиного антитела к CD89 человека, хорошо известный блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали параллельно, и он также показал дозозависимое блокирование связывания сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека. Кроме того, клон 59 и клон A3 мышиных антител, специфичных в отношении CD89 человека, дозозависимо и частично ингибировали (т. е. $\approx 60\%$ максимальное ингибирование) связывание неагрегированного и термоагрегированного сывороточного IgA человека с мембранным CD89 человека, что подтвердило наши предыдущие результаты с использованием этих двух хорошо известных не блокирующих CD89/IgA антител (см. Примеры 2 (d) выше).

30 Чтобы проанализировать степень блокирования CD89/IgA очищенными химерными мышиными/человеческими антителами к CD89 человека, способность очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека стерически препятствовать взаимодействию секреторного IgA человека с CD89 человека определяли с помощью FACS-анализа.

Клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3). Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл титрованного (в 5 ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного химерного мышиноного/человеческого антитела к CD89 человека/пробирку или без него в течение 30 минут при 4°C . Одновременно с этим 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного клона MIP8a мышиноного антитела к CD89 человека (BioRad) анализировали в качестве положительного контроля. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного IgA человека (полученного из молозива) (BioRad) при 0,20 мкМ (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) и инкубировали еще 10 30 минут при 4°C . После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 связывание секреторного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')_2 козьих антител, специфичных в отношении α -цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в 15 течение 30 минут при 4°C . После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C . После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 клетки фиксировали в 4% формальдегиде в ФСБ/БСА/ NaN_3 в течение 30 минут при 4°C . Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) секреторного IgA 20 человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 17С, все очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо предотвращали связывание секреторного IgA человека с мембранным CD89 25 человека. На основании их профиля блокирования CD89/IgA установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени блокирования CD89/IgA): 20B4>30C7>8F3=10E7>16D6, что согласовывалось со степенью блокирования CD89/IgA с использованием сывороточного IgA человека, обнаруженной в FACS (см. Фигуру 17А и 17В). Интересно, что, по-видимому, существовала сильная положительная взаимосвязь 30 между степенью стерического блокирования связывания секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека (этот пример) этих исследованных очищенных мышинных антител к CD89 человека и их соответствующей относительной аффинностью связывания в отношении мембранного CD89 человека (см. Пример 7 (a) выше). В референсных целях очищенный клон MIP8a мышиноного антитела к CD89 человека, хорошо известный 35 блокатор CD89/IgA (Zhang et al. Clin Exp Immunol 2000; 121: 106-111), анализировали

параллельно, и он также показал дозозависимое блокирование связывания секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека.

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA химерное мышиное/человеческое антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 предотвращало связывание мономерного, димерного, тримерного, тетрамерного или более высокого порядка мультимерного сывороточного IgA человека (т. е. неагрегированного и термоагрегированного IgA) и димерного секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека.

Пример 8. Биологическая характеристика блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих моноклональных антител к CD89 человека с использованием *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека

(а). Связывание блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека на первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека

Для определения связывания очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека на первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, использовали FACS-анализ.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здорового донора (после информированного согласия) с помощью градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ гранулоциты помещали при 10×10⁶ клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma-Aldrich; ФСБ/БСА) с добавлением 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma-Aldrich), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. 0,1×10⁶ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл химерного мышиное/человеческого антитела, специфичного в отношении CD89 человека (т. е. 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7), при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА) или без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали 100 мкл очищенного изотипического контрольного антитела IgG4 человека (опдиво®; Bristol-Myers Squibb) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА). После тщательной промывки в ФСБ/БСА клетки затем инкубировали с разведенными 1:100 конъюгированными с изотиоцианатом флуоресцеина мышинными антителами, специфичными в отношении IgG4 человека (Sigma-Aldrich), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА в течение 30 минут при 4°C. Связывание

(среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека измеряли с использованием проточного цитометра (Cyan; BeckmanCoulter).

Как показано на Фигуре 18, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела к CD89 человека (при 10 мкг/мл) связывались с мембранным CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, выделенных от нескольких доноров (n=3). На основании их профиля связывания на нейтрофильных гранулоцитах установили следующую очередность (от высокой к более низкой интенсивности связывания): 8F3=10E7=30C7=20B4>16D6.

Эти результаты также продемонстрировали, что наше блокирующее CD89/IgA химерное мышинное/человеческое антитело к CD89 человека 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 распознавало неполиморфные эпитопы на мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, поскольку эти антитела однозначно связывались с нейтрофильными гранулоцитами человека, выделенными от всех 3 исследованных доноров.

(b). Блокирование опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, с использованием блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека ингибировать фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ гранулоциты ресуспендировали при 2,0×10⁶ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich). Затем по 100 мкл/лунку (т. е. 0,2×10⁶ клеток в 96-луночных планшетах с плоским дном; Greiner) этих клеток инкубировали с титрованным (в RPMI/10% ФТС) очищенным химерным мышинным/человеческим антителом к CD89 человека (т. е. 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7) в течение 20 минут при 4°C. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли

1,2 мкл флуоресцентных латексных гранул, покрытых очищенным (полученным из сыворотки) IgA человека (MP Biomedicals), (размером 1 мкм и модифицированный карбоксилатом полистирол; Sigma-Aldrich) при отношении клеток к гранулам 1:60 (приготовление IgA-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383) и инкубировали еще 30 минут при 37°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали флуоресцентные латексные гранулы, покрытые БСА (Sigma-Aldrich), при отношении клеток к гранулам 1:60 (приготовление БСА-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383). После промывки в RPMI/10% ФТС и ресуспендирования в ФСБ/0,1% БСА (Sigma-Aldrich) опосредуемый сывороточным IgA человека фагоцитоз флуоресцентных латексных гранул (среднегеометрическая интенсивность флуоресценции использовалась для расчета фагоцитарного индекса в соответствии с Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383) мембранным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека измеряли с использованием проточного цитометра (Суан; Beckman Coulter). Для сравнения клон М1Р8а, клон А59 и клон А3 коммерческих мышинных антител к CD89 человека анализировали параллельно, как описано в Примере 3 (b).

Как показано на Фигуре 19, все очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека, дозозависимо ингибировали опосредуемый сывороточным IgA человека фагоцитоз в *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами. На основании их степени ингибирования опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза установили следующую очередность (от сильной к более низкой степени ингибирования IgA-опосредуемого фагоцитоза): 8F3=10E7=30C7>20B4>16D16.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA химерное мышинное/человеческое антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7 ингибировало опосредуемую сывороточным IgA человека фагоцитарную активность *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека.

(c). Блокирование опосредуемой сывороточным IgA человека миграции первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, опосредуемого сывороточным IgA человека хемотаксиса указанных клеток и опосредуемой сывороточным IgA человека продукции лейкотриена В4 из указанных клеток с

использованием блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека, определяли
5 способность созданных блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека ингибировать (1) опосредуемую сывороточным IgA человека миграцию, (2) опосредуемый сывороточным IgA человека хемотаксис и (3) опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию нейтрофил-хемотактантного лейкотриена B4 (LTB4) из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89
10 человека.

Анализ двумерной (2-D) миграции: первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. Затем эти
15 первичные нейтрофильные гранулоциты человека метили 1 мкМ флуоресцентного кальцеина-AM (Molecular Probes) в течение 30 минут при 37°C. После промывки эти меченые кальцеином-AM гранулоциты ресуспендировали при 2,5×10⁶ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем 100 мкл меченых кальцеином-AM гранулоцитов (т. е. 0,25×10⁶ клеток/лунку в 96-
20 луночных планшетах с плоским дном; Greiner) инкубировали с 20 мкг/мл (в RPMI/10% ФТС) очищенного химерного мышиного/человеческого антитела к CD89 человека (т. е. 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7) в течение 20 минут при 4°C. Одновременно с этим 20 мкг/мл (в RPMI/10%ФТС) очищенного изотипического контрольного IgG4 человека (Sigma-Aldrich) анализировали в качестве отрицательного контроля. После этого
25 добавляли 150 мкл RPMI/10% ФТС на лунку и клетки оставляли на 10 минут, чтобы они снова стали монослоями. После этого (т. е. без промывки) к этим монослоям клеток осторожно добавляли 10 мкл гранул сефарозы 4В, покрытых очищенным (полученным из сыворотки) IgA человека (MP Biomedicals) (размером 90 мкм и активированных бромцианом; GE Healthcare) (приготовление 3 мкг/мл IgA-гранул, см. Van der Steen et al.
30 Gastroenterol 2009; 137: 2018-2029), и инкубировали еще 40 минут при 37°C. Одновременно с этим покрытые БСА (Sigma-Aldrich) гранулы сефарозы 4В анализировали в качестве отрицательного контроля (приготовление 3 мкг/мл БСА-гранул, см. Van der Steen et al. Gastroenterol 2009; 137: 2018-2029). Затем супернатанты собирали и использовали для анализа хемотаксиса и ИФА LBT4 (см. ниже), и гранулы сефарозы
35 промывали для удаления несвязанных/немигрировавших гранулоцитов, меченных

кальцеином-АМ. Затем гранулоциты лизировали в буфере с 0,2% (масс./об.) бромида гексадецилтриметиламмония (Sigma-Aldrich) в течение 30 минут при КТ, и высвобожденный кальцеин-АМ (отражающий число IgA-связанных/мигрировавших гранулоцитов) измеряли в 96-луночных планшетах с плоским дном (Greiner) с использованием флуорометра (FLUOstar/POLARstar; BMG Labtech). Число IgA-связанных/мигрировавших *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека количественно определяли с использованием стандартной кривой с известным числом лизированных гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ (т. е. $0-0,3 \times 10^6$ клеток/лунку). Для сравнения клон МР8а, клон А59 и клон А3 коммерческих мышинных антител к CD89 человека анализировали параллельно, как описано в Примере 3 (с).

Анализ хемотаксиса: первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. Затем эти первичные нейтрофильные гранулоциты человека метили 1 мкМ флуоресцентного кальцеина-АМ (Molecular Probes) в течение 30 минут при 37°C. После промывки эти меченые кальцеином-АМ гранулоциты ресуспендировали при $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich). Для измерения хемотаксиса лунки нижнего отсека камеры Бойдена (Neuro Probe) заполняли 29 мкл супернатантов из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, стимулированных покрытыми IgA гранулами сефарозы (т. е. от другого здорового донора, см. выше). Одновременно с этим только среду RPMI/10% ФТС и очищенный 1 или 10 нМ LTB₄ (в RPMI; Sigma-Aldrich) анализировали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Затем нижний отсек покрывали поликарбонатным фильтром с размером пор 3 мкм, покрытым поливинилпирролидоном (Neuro Probe), с последующей сборкой верхнего отсека на нижнем отсеке камеры Бойдена. После этого в лунки верхнего отсека добавляли 50 мкл гранулоцитов, меченных кальцеином-АМ (т. е. $0,05 \times 10^6$ клеток/лунку). После инкубации в течение 40 минут при 37°C определяли хемотаксис *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека из верхнего отсека в лунки нижнего отсека. С этой целью гранулоциты в нижнем отсеке лизировали в буфере с 0,1% (масс./об.) бромида гексадецилтриметиламмония (Sigma-Aldrich) в течение 30 минут при КТ, и высвобожденный кальцеин-АМ (отражающий число хемотаксических гранулоцитов) измеряли в 96-луночных планшетах с плоским дном (Greiner) с использованием флуорометра (FLUOstar/POLARstar; BMG Labtech). Число хемотаксических *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, индуцированных

покрытыми IgA гранулами сефарозы, количественно определяли с использованием стандартной кривой с известным числом лизированных гранулоцитов, меченных кальцеином-AM (т. е. $0-0,05 \times 10^6$ клеток/лунку).

5 ЛТВ4 ИФА: Уровни ЛТВ4 измеряли в супернатантах от *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, стимулированных покрытыми IgA гранулами сефарозы (см. выше). С этой целью коммерчески доступный набор для конкурентного ИФА ЛТВ4 (R&D Systems) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

10 Как показано на Фигуре 20А, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), при 20 мкг/мл ингибировали опосредуемую гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, миграцию *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

15 Как показано на Фигуре 20В, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), при 20 мкг/мл ингибировали опосредуемый гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, хемотаксис *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от двух здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

20 Как показано на Фигуре 20С, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), при 20 мкг/мл ингибировали опосредуемую гранулами сефарозы, покрытыми сывороточным IgA человека, продукцию хемоаттрактантного ЛТВ4 *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими мембранный CD89 человека, выделенными от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

30 Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA химерное мышинное/человеческое антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 20B4 и 30C7 ингибировало опосредуемую сывороточным IgA человека миграцию, хемотаксис и высвобождение хемоаттрактантного ЛТВ4 из *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека.

(d). Блокирование опосредуемой сывороточным IgA человека продукции лактоферрина из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с использованием блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих 35 моноклональных антител к CD89 человека

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA химерных мышинных/человеческих антител к CD89 человека ингибировать опосредуемую сывороточным IgA человека
5 продукцию лактоферрина из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом
10 эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. Затем эти первичные нейтрофильные гранулоциты человека метили 1 мкМ флуоресцентного кальцеина-AM (Molecular Probes) в течение 30 минут при 37°C. После промывки эти меченые кальцеином-AM гранулоциты ресуспендировали при 2,0×10⁶ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем
15 100 мкл меченых кальцеином-AM гранулоцитов (т. е. 0,2×10⁶ клеток/лунку) инкубировали с титрованным (в RPMI/10% ФТС) очищенным химерным мышинным/человеческим антителом к CD89 человека (т. е. 8F3, 10E7, 16D6, 20B4 и 30C7) в течение 20 минут при 4°C. После этого (т. е. без промывки) 100 мкл этих клеток (т. е. 0,2×10⁶ клеток/лунку) добавляли в 96-луночные планшеты для ИФА с плоским дном (Nunc-Immuno MaxiSorp),
20 которые предварительно были покрыты либо 100 мкл/лунку очищенного IgA человека (полученного из сыворотки) (MP Biomedicals) при 10 мкг/мл, либо 100 мкл/лунку БСА (используемого в качестве отрицательного контроля; Sigma-Aldrich) при 10 мкг/мл. После инкубации в течение 30 минут при 37°C супернатанты (180 мкл/лунку) собирали для удаления несвязанных гранулоцитов, и эти супернатанты использовали (после нескольких
25 этапов очистки центрифугированием) для измерения уровней продукции лактоферрина (использованного в качестве маркера дегрануляции; см. ниже). Для сравнения клон MIP8a, клон A59 и клон A3 коммерческих мышинных антител к CD89 человека анализировали параллельно, как описано в Примере 3 (d).

Продукцию лактоферрина измеряли в супернатантах первичных нейтрофильных
30 гранулоцитов человека (представляющую степень дегрануляции), которые стимулировали связанным с планшетом сывороточным IgA человека (см. выше). Для этого 96-луночные планшеты для ИФА с плоским дном (Nunc-Immuno MaxiSorp) покрывали 100 мкл/лунку кроличьих антител к лактоферрину человека (1:5000; Sigma-Aldrich) в течение 16-24 часов при 4-8°C. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали
35 200 мкл/лунку ФСБ/0,05% Tween 20/0,5% БСА (Sigma-Aldrich) в течение 1 часа при КТ.

Затем планшеты инкубировали со 100 мкл/лунку супернатанта в разведении 1:2 (в блокирующем буфере) в течение 1 часа при 37°C. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты инкубировали с мечеными щелочной фосфатазой кроличьими детектирующими антителами к лактоферрину человека (1:2500; MP Biomedicals) в течение 1 часа при 37°C. После добавления Р-нитрофенилфосфата (Sigma-Aldrich) измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов (iMark; Bio-Rad). Очищенный лактоферрин человека (Sigma-Aldrich) использовали в качестве стандарта для расчета количества лактоферрина, высвобождаемого *ex vivo* нейтрофильными гранулоцитами человека, стимулированными сывороточным IgA человека.

Как показано на Фигуре 21, все наши очищенные блокирующие CD89/IgA химерные мышинные/человеческие антитела, специфичные в отношении CD89 человека (за исключением 16D6), дозозависимо ингибировали опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию лактоферрина *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, выделенными от двух здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

Эти результаты продемонстрировали, что блокирующее CD89/IgA химерное мышинное/человеческое антитело, специфичное в отношении CD89 человека, 8F3, 10E7, 20B4 и 30C7 ингибировало IgA-опосредуемую продукцию лактоферрина (маркера дегрануляции) *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека.

Пример 9. Создание блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7

На основе определенных мышинных V-областей (см. Пример 5 выше) блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека 10E7 создавали варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7.

In silico гуманизированные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (3) и гуманизированные последовательности вариабельной области легкой цепи (4) блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека 10E7 получали с использованием технологии PDL (выполненной Исследовательским институтом Panorama, Саннивейл, Калифорния, США). Аминокислотные последовательности гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи блокирующего CD89/IgA мышинного антитела к CD89 человека 10E7 см. в SEQ ID NO: 117 (VH1), 118 (VH2), 119 (VH3), 120 (VL1), 121 (VL2), 122 (VL3) и 123 (VL4).

После конструирования последовательности кДНК, оптимизированные для *Cricetulus griseus*, SEQ ID NO: 124, 125, 126 (кодирующие варианты полноразмерной гуманизированной тяжелой цепи IgG4 10E7, т. е. VH1, VH2, VH3, соответственно) и SEQ ID NO: 127, 128, 129, 130 (кодирующие варианты полноразмерной гуманизированной легкой к-цепи 10E7, т. е. VL1, VL2, VL3, VL4, соответственно), заказывали в компании GENEART (Регенсбург, Германия), которые кодировали сигнальный пептид человека, за которым следовала либо гуманизированная вариабельная область тяжелой цепи, связанная с человеческой стабилизированной (т. е. S239P; в соответствии с Angal et al in Mol. Immunol., Vol. 30, No. 1, pp. 105-108, 1993) константной областью IgG4, либо за которым следовала гуманизированная вариабельная область легкой цепи, связанная с человеческой константной областью каппа. Используя подходящие рестрикционные ферменты, созданные кДНК субклонировали в экспрессионные плазмиды, полученные из pcDNA3.1. Варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 затем временно экспрессировали в клетках 293-F (Invitrogen) с использованием экспрессионной системы FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Супернатанты, содержащие эти экспрессированные варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7, исследовали на их связывание против *ghu*CD89 и мембраносвязанного CD89 человека с использованием обычного ИФА и проточной цитометрии (Пример 10, см. ниже), соответственно.

Таким образом, создавали двенадцать гуманизированных вариантов блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7, т. е. VH1VL1, VH1VL2, VH1VL3, VH1VL4, VH2VL1, VH2VL2, VH2VL3, VH2VL4, VH3VL1, VH3VL2, VH3VL3 и VH3VL4.

Гуманизированные аминокислотные последовательности блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 приведены в SEQ ID NO: 131, 132, 133 (кодирующих варианты полноразмерной гуманизированной тяжелой цепи IgG4 10E7, т. е. VH1, VH2, VH3, соответственно), и SEQ ID NO: 134, 135, 136, 137 (кодирующих варианты полноразмерной гуманизированной легкой к-цепи 10E7, т. е. VL1, VL2, VL3, VL4, соответственно).

Пример 10. Характеристика связывания блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7

(а). Относительная аффинность связывания вариантов блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 в отношении CD89 человека

Для определения относительной аффинности связывания вариантов блокирующего CD89/IgA гуманизованного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 в отношении CD89 человека использовали ИФА и FACS-анализ.

ИФА: rhuCD89 (Sino Biological) наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ (50 нг/100 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов MaxiSorp (NUNC) в течение 16-24 часов при 4-8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% БСА (Roche) в течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали со 100 мкл титрованного (в экспрессионной среде FreeStyle™ 293 (Invitrogen); концентрации антител в супернатантах (см. Пример 9) предварительно определяли против внутреннего стандарта IgG4к человека с использованием прибора для интерферометрии биослоев Octet® в комбинации с наконечниками биосенсора с белком А) гуманизованного антитела к CD89 человека 10E7/лунку и без него в течение 1 часа при КТ. Химерное антитело к CD89 человека 10E7 (см. Пример 6) анализировали параллельно в качестве референсного. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 связывание антител на rhuCD89 определяли с использованием разведенных 1:5000 конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) козьих антител, специфичных в отношении Fcγ IgG человека (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при КТ, а затем добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М HCl связывание (оптическую плотность) антител на rhuCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (Synergy HTX; BioTek).

FACS: клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fcγ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 100 мкл титрованного (в экспрессионной среде FreeStyle™ 293 (Invitrogen); концентрации антител в супернатантах (см. Пример 9) предварительно определяли против внутреннего стандарта IgG4к человека с использованием прибора для интерферометрии биослоев Octet® в комбинации с наконечниками биосенсора с белком А) гуманизованного антитела к CD89 человека 10E7/пробирку или без него в течение 30 минут при 4°C. Химерное антитело к CD89 человека 10E7 (см. Пример 6) анализировали параллельно в качестве референсного. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими

антителами, специфичными в отношении Fc γ IgG человека (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 4% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 25А, все варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. VH1VL1, VH1VL2, VH1VL3, VH1VL4, VH2VL1, VH2VL2, VH2VL3, VH2VL4, VH3VL1, VH3VL2, VH3VL3 и VH3VL4) и блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 дозозависимо связывались с rhuCD89. Блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. референсное) и варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3VL3 и VH3VL4 показали сходные S-образные кривые титрования, которые показали, что их аффинность связывания против rhuCD89 была сходной (полумаксимальное связывание ЭК₅₀ \approx 20 нг/мл), в то время как варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH1VL1, VH1VL2, VH1VL3, VH1VL4, VH2VL1, VH2VL2, VH2VL3, VH2VL4, VH3VL1 и VH3VL2 показали значительно более низкую аффинность связывания, что подтверждается более низкими максимальными сигналами оптической плотности или непохожими кривыми титрования.

Как показано на Фигуре 25В, все варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. VH1VL1, VH1VL2, VH1VL3, VH1VL4, VH2VL1, VH2VL2, VH2VL3, VH2VL4, VH3VL1, VH3VL2, VH3VL3 и VH3VL4) и блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 дозозависимо связывались с мембраносвязанным CD89 человека. Блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. референсное) и варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3VL3 и VH3VL4 показали сходные S-образные кривые титрования, которые показали, что их аффинность связывания против мембраносвязанного CD89 человека была сходной (полумаксимальное связывание ЭК₅₀ \approx 1000 нг/мл), в то время как варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH1VL1, VH1VL2, VH1VL3, VH1VL4, VH2VL1, VH2VL2, VH2VL3, VH2VL4, VH3VL1 и VH3VL2 показали значительно более низкую аффинность

связывания, что подтверждается более низкими максимальными флуоресцентными сигналами или непохожими кривыми титрования.

После скрининга супернатантов отобрали блокирующее CD89/IgA гуманизованное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3VL3.

5 Однако CDR2 (см. SEQ ID NO: 46) в вариабельной области тяжелой цепи блокирующего CD89/IgA моноклонального антитела к CD89 человека 10E7 содержит два мотива дезамидирования «аспарагин-глицин» («Asn-Gly»), которые склонны к дезамидированию (Sydow et al. PLoS ONE 2014; 9(6): e100736). Дезамидирование представляет собой химическую реакцию, при которой амидная функциональная группа в боковой цепи
10 аминокислоты аспарагина превращается в другую функциональную группу. Обычно аспарагин превращается в аспарагиновую кислоту или изоаспарагиновую кислоту. В случае с антителом эта реакция может стать серьезным фактором риска, поскольку эта реакция может изменить структуру, стабильность или функцию антитела (например, связывание антитела с антигеном) и может привести к деградации антитела. Таким
15 образом, *in silico* гуманизованные последовательности вариабельной области тяжелой цепи «с устраненным дезамидированием CDR2» блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека 10E7 получали с использованием структурной модели Fv (выполненной Applied Protein Services, Lonza Biologics, Кембридж, Великобритания). На основании этой детальной оценки VH:Asn52 и VH:Asn54 заменяли (1) комбинацией
20 (VH3SQ) VH:Ser52 и VH:Gln54, соответственно, и (2) комбинацией (VH3ST) VH:Ser52 и VH:Thr54, соответственно. Аминокислотные последовательности гуманизованной вариабельной области тяжелой цепи «с устраненным дезамидированием CDR2» блокирующего CD89/IgA мышинового антитела к CD89 человека 10E7 приведены в SEQ ID NO: 138 (VH3SQ) и 139 (VH3ST).

25 После конструирования последовательности кДНК, оптимизированные для *Cricetulus griseus*, SEQ ID NO: 140, 141 (кодирующие варианты полноразмерной и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизованной тяжелой цепи IgG4 10E7, т. е. VH3SQ, VH3ST, соответственно) и SEQ ID NO: 129 (кодирующей вариант полноразмерной гуманизованной легкой к-цепи 10E7, т. е. VL3) заказывали в компании
30 GENEART (Регенсбург, Германия), которые кодировали человеческий сигнальный пептид, за которым следовала либо гуманизованная вариабельная область тяжелой цепи «с устраненным дезамидированием CDR2», связанная с человеческой стабилизированной (т. е. S239P; в соответствии с Angal et al in Mol. Immunol., Vol. 30, No. 1, pp. 105-108, 1993) константной областью IgG4, либо за которым следовала гуманизованная вариабельная
35 область легкой цепи, связанная с человеческой константной областью каппа. Используя

подходящие рестрикционные ферменты, созданные кДНК субклонировали в экспрессионные плазмиды, полученные из pcDNA3.1. Варианты блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 затем временно экспрессировали в клетках 293-F (Invitrogen) с использованием экспрессионной системы FreeStyle™ 293 (Invitrogen). После сбора супернатантов варианты блокирующего CD89/IgA и «с
5 устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 очищали с использованием обычных колонок для аффинной хроматографии с белком А и затем исследовали на их связывание против rhuCD89 и мембраносвязанного CD89 человека с использованием обычного ИФА и
10 проточной цитометрии (см. Пример 10 (b) ниже), соответственно. Кроме того, уровни ЛПС определяли с использованием LAL-хромогенного анализа по конечной точке (Hycult Biotech), при этом варианты блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 содержали <0,002 ЕЭ ЛПС/мкг гуманизированного IgG.

15 Таким образом, создали два гуманизированных варианта «с устраненным дезамидированием CDR2» блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7, т. е. VH3SQVL3 и VH3STVL3.

Гуманизированные аминокислотные последовательности «с устраненным дезамидированием CDR2» блокирующего CD89/IgA гуманизированного антитела к CD89
20 человека 10E7 приведены в SEQ ID NO: 142, 143 (кодирует варианты полноразмерной «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированной тяжелой цепи IgG4 10E7, т. е. VH3SQ, VH3ST, соответственно), и SEQ ID NO: 136 (кодирует вариант полноразмерной гуманизированной легкой к-цепи 10E7, т. е. VL3).

(b). Относительная аффинность связывания вариантов блокирующего CD89/IgA и «с
25 устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 в отношении CD89 человека

Для определения относительной аффинности связывания вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 с
30 CD89 человека использовали ИФА и FACS-анализ.

ИФА: rhuCD89 (10414-H08H, Sino Biological, Inc) наносили в виде покрытия при 0,5 мкг/мл в ФСБ (50 нг/100 мкл/лунку) с использованием 96-луночных планшетов MaxiSorp (NUNC) в течение 16-24 часов при 4-8°C. После тщательной промывки ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали ФСБ/0,05% Tween 20/1% БСА (Roche) в
35 течение 1 часа при КТ. Затем планшеты инкубировали со 100 мкл титрованного (в

ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7/лунку и без него в течение 1 часа при КТ. Химерное антитело к CD89 человека 10E7 (см. Пример 6) анализировали параллельно в качестве референсного. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 связывание антител на μ hCD89 определяли с помощью разведенных 1:5000 конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) козьих антител, специфичных в отношении Fc γ IgG человека (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при КТ, а затем добавляли готовый к использованию раствор субстрата ТМВ (Invitrogen) для колориметрического детектирования. После добавления 1 М HCl связывание (оптическую плотность) антител на μ hCD89 измеряли при длине волны 450 нм (референсная длина волны 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов (Synergy HTX; BioTek).

FACS: клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN₃ (ФСБ/БСА/NaN₃) и дополненный 50 мкг/мл IgG человека (блокирует возможные рецепторы Fc γ ; Sigma), на 10 минут при 4°C. Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали со 100 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/NaN₃) очищенного гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 «с устраненным дезамидированием CDR2»/пробирку и без него в течение 30 минут при 4°C. Химерное антитело к CD89 человека 10E7 (см. Пример 6) анализировали параллельно в качестве референсного. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 ФЭ-конъюгированными козьими антителами, специфичными в отношении Fc γ IgG человека (Jackson ImmunoResearch), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/NaN₃ клетки фиксировали в 4% формальдегиде в ФСБ/БСА/NaN₃ в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 26А, как варианты «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, так и химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 дозозависимо связывались с μ hCD89. Блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. референсное) и варианты блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 показали сходные S-образные кривые титрования, которые

показали, что их аффинность связывания против связанного с планшетом rhCD89 была сходной (полуМаксимальное связывание $\text{ЭК}_{50} \approx 10$ нг/мл).

Как показано на Фигуре 26В, как варианты «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7
5 VH3SQVL3 и VH3STVL3, так и химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 дозозависимо связывались с мембраносвязанным CD89. Неожиданно оказалось, что блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. референсное) и оба варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела
10 IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 показали непохожие S-образные кривые титрования, которые указывали на то, что аффинность связывания обоих вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7
15 VH3SQVL3 и VH3STVL3 против мембранного CD89 человека была выше (полуМаксимальное связывание $\text{ЭК}_{50} \approx 600$ нг/мл), чем аффинность связывания блокирующего CD89/IgA химерного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (полуМаксимальное связывание $\text{ЭК}_{50} \approx 1300$ нг/мл). Таким образом, оба варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7
20 VH3SQVL3 и VH3STVL3, по-видимому, повышают свою аффинность связывания с мембраносвязанным CD89 человека во время процесса «устранения дезамидирования CDR2».

(с). Степень CD89/IgA-блокирующей способности вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела
25 IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3

Чтобы проанализировать степень блокирования CD89/IgA очищенных вариантов «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, способность очищенных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2»
30 гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 стерически препятствовать взаимодействию сывороточного или секреторного IgA человека с CD89 человека определяли с помощью FACS-анализа.

Клетки HEK293F, стабильно трансфицированные полноразмерным CD89 человека (клон № 2; см. Пример 1 (b) выше), помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на
35 льду ФСБ, содержащий 0,1% БСА (Sigma)/0,05% NaN_3 (ФСБ/БСА/ NaN_3). Затем по 10

мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих клеток инкубировали с 50 мкл титрованных (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3/пробирку или без них в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 50 мкл титрованного (в ФСБ/БСА/ NaN_3) очищенного химерного антитела к CD89 человека 10E7 (см. Пример б) анализировали в качестве референсного. После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 50 мкл очищенного полученного из сыворотки IgA человека (Bethyl Laboratories) при 0,20 мкг/мл (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) или полученного из молозива IgA (BioRad) при 0,16 мкМ (разведенного в ФСБ/БСА/ NaN_3) и инкубировали еще 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 связывание сывороточного IgA человека или секреторного IgA человека на мембранном CD89 человека определяли с использованием конъюгированных с биотином фрагментов F(ab')_2 козьих антител, специфичных в отношении α -цепи сывороточного IgA человека (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 добавляли разведенный 1:200 ФЭ-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА/ NaN_3 клетки фиксировали в 4% формальдегиде в ФСБ/БСА/ NaN_3 в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) сывороточного IgA человека или секреторного IgA человека на мембранном CD89 человека измеряли с использованием проточного цитометра (FACSCalibur; BD Biosciences).

Как показано на Фигурах 27А и 27В, как варианты «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, так и блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 дозозависимо предотвращали связывание сывороточного и секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека. Неожиданно оказалось, что блокирующее CD89/IgA химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. референсное) и оба варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 показали непохожие кривые ингибирующего титрования, это указывает на то, что ингибирование CD89/IgA обоими вариантами «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 было более сильным (полумаксимальное ингибирование $\text{IC}_{50} \approx 900$ нг/мл и $\text{IC}_{50} \approx 600$ нг/мл для сывороточного IgA человека и секреторного IgA

человека, соответственно), чем ингибирование CD89/IgA химерным моноклональным антителом IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (полумаксимальное ингибирование ИК₅₀≈1600 нг/мл и ИК₅₀≈1000 нг/мл для сывороточного IgA человека и секреторного IgA человека, соответственно). Таким образом, оба варианта «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, по-видимому, увеличивали степень своей способности блокировать CD89/IgA во время процесса «устранения дезамидирования CDR2», что согласовывалось с их повышенной аффинностью связывания в отношении мембраносвязанного CD89 человека (см. Пример 10 (b) выше).

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что варианты блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 предотвращали связывание мономерного сывороточного IgA человека и димерного секреторного IgA человека с мембранным CD89 человека.

(d). Равновесная константа диссоциации (K_D) вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 для CD89 человека

Для определения равновесной константы диссоциации (K_D) вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 для CD89 человека использовали анализ на основе BLI/Octet[®].

Биотинилированные (с использованием N-гидроксисукцинимидобиотина от Pierce) очищенные варианты «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 загружали при 2,5 мкг/мл в ФСБ/0,1% БСА/0,02% Tween 20 (pH 7,4) на наконечники биосенсора со стрептавидином (ForteBio) в течение 5 минут при 30°C. Затем ассоциацию мономерного рекомбинантного меченого на С-конце полигистидином человеческого (внеклеточного) анализита CD89 (rhuCD89 (10414-H08H, Sino Biological, Inc)) при 0 нМ (референсный образец для отслеживания смещения базовой линии) и при 0,31–20 нМ (2-кратное разведение в ФСБ/0,1% БСА/0,02% Tween 20) измеряли в течение 5 минут при 30°C с последующей фазой диссоциации в течение 20 минут при 30°C с использованием прибора Octet[®] RED96 (ForteBio). Биотинилированные (с использованием N-гидроксисукцинимидобиотина от Pierce) очищенные мышинные и химерные аналоги антитела к CD89 человека 10E7 (см. Пример 2 и Пример 6, соответственно) тестировали в сравнительных целях. Равновесные

константы диссоциации (K_D) определяли с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 в программном обеспечении Octet[®] RED96 (ForteBio).

Как варианты «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизованного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, так и химерное моноклональное антитело IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 и мышинное моноклональное антитело к CD89 человека 10E7 показали высокую аффинность связывания с растворимым мономерным ρ huCD89. Неожиданно оказалось, что оба варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизованного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 показали более высокую аффинность связывания с растворимым мономерным ρ huCD89 (т. е. значение K_D 0,82 нМ и 0,92 нМ, соответственно), чем аффинность связывания блокирующего CD89/IgA химерного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 (т. е. значение K_D 1,28 нМ) и блокирующего CD89/IgA мышинного моноклонального антитела к CD89 человека 10E7 (т. е. значение K_D 1,67 нМ).

В совокупности, оба варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизованного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, по-видимому, повышают свою аффинность связывания в отношении растворимого мономерного ρ huCD89 в процессе «устранения дезамидирования CDR2». Обобщенные данные приведены в Таблице 9.

Таблица 9. Результаты исследованных параметров кинетики связывания из анализов кинетики Octet[®], выполненных с использованием очищенных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизованного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, химерного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 и мышинного моноклонального антитела к CD89 человека 10E7 на растворимом мономерном ρ huCD89.

Параметры кинетики связывания

Вариант антитела к CD89 10E7	K_{on} ($\times 10^5$ 1/Мс)	K_{off} ($\times 10^{-4}$ 1/с)	K_D (нМ)
Мышиное*	6,87 \pm 1,61	11,10 \pm 0,14	1,67 \pm 0,41
Химерное**	8,32	10,60	1,28
Гуманизованный VH3SQVL3**	11,50	9,41	0,82
Гуманизованный	10,60	9,74	0,92

VH3STVL3**			
------------	--	--	--

*Результаты (среднее значение \pm стандартное отклонение) из 2 независимых экспериментов, ** результаты из 1 независимого эксперимента.

**Пример 11. Биологическая характеристика вариантов блокирующего CD89/IgA и «с
5 устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального
антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 с
использованием *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека,
экспрессирующих CD89 человека**

(а). Связывание вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием
10 CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7
VH3SQVL3 и VH3STVL3 на первичных нейтрофильных гранулоцитах человека,
экспрессирующих CD89 человека

Для определения связывания очищенных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с
устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела
15 IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 на первичных
нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих CD89 человека, использовали
FACS-анализ.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической
крови здорового донора (после информированного согласия) с использованием
20 градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом
эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ
гранулоциты помещали при 10×10^6 клеток/мл в охлажденный на льду ФСБ, содержащий
0,1% БСА (Sigma-Aldrich; ФСБ/БСА). Затем по 10 мкл/пробирку (т. е. $0,1 \times 10^6$ клеток) этих
клеток инкубировали со 100 мкл очищенного гуманизированного антитела к CD89
25 человека 10E7 «с устраненным дезамидированием CDR2» при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА) или
без него в течение 30 минут при 4°C. Одновременно с этим 100 мкл очищенного
изотипического контрольного антитела IgG4 человека (Sigma-Aldrich) при 10 мкг/мл (в
ФСБ/БСА) анализировали в качестве отрицательного контроля. Кроме того, в качестве
референсного анализировали 100 мкл очищенного химерного антитела к CD89 человека
30 10E7 (см. Пример 6) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА). После тщательной промывки в
ФСБ/БСА клетки затем инкубировали с разведенными 1:200 конъюгированными с
биотином мышиными антителами, специфичными в отношении IgG4 человека
(Invitrogen), в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА клетки
инкубировали с разведенным 1:200 ФЭ-конъюгированным стрептавидином (Jackson

ImmunoResearch) в течение 30 минут при 4°C. После тщательной промывки в ФСБ/БСА клетки фиксировали в 2% формальдегиде в ФСБ/БСА в течение 30 минут при 4°C. Связывание (среднегеометрическую интенсивность флуоресценции) антител на мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека измеряли с использованием проточного цитометра (Attune; Thermo Fisher).

5 Как показано на Фигуре 28, оба очищенных варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 (при 10 мкг/мл) связывались с мембранным CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, выделенных от нескольких доноров (n=3).

10 Эти результаты также продемонстрировали, что варианты блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 распознавали неполиморфные эпитопы на мембранном CD89 человека из *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитов человека, поскольку эти антитела однозначно связывались с нейтрофильными гранулоцитами человека, выделенными от всех 3 исследованных доноров.

15 (b). Блокирование опосредуемого сывороточным IgA человека фагоцитоза первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека, с использованием вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3

20 Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3, определяли способность созданных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 ингибировать фагоцитоз латексных гранул, покрытых сывороточным IgA человека, первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека.

25 Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. После промывки в ФСБ

гранулоциты ресуспендировали при $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich). Затем по 100 мкл/лунку (т. е. $0,2 \times 10^6$ клеток в 96-луночных планшетах с плоским дном; Greiner) этих клеток инкубировали с титрованным (в RPMI/10% ФТС) очищенным гуманизированным антителом к CD89 человека «с устранимым дезамидированием CDR2» 10E7 в течение 20 минут при 4°C. Одновременно с этим очищенное изотипическое контрольное антитело IgG4 человека (Sigma-Aldrich) анализировали в качестве отрицательного контроля. Кроме того, в качестве референсного анализировали очищенное химерное антитело к CD89 человека 10E7 (см. Пример б) при 10 мкг/мл (в ФСБ/БСА). После этого (т. е. без промывки) к этим клеткам добавляли 1,2 мкл флуоресцентных латексных гранул, покрытых очищенным (полученным из сыворотки) IgA человека (MP Biomedicals), (размером 1 мкм и модифицированный карбоксилатом полистирол; Sigma-Aldrich), при отношении клеток к гранулам 1:60 (приготовление IgA-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383) и инкубировали еще 30 минут при 37°C. Одновременно с этим в качестве отрицательного контроля анализировали флуоресцентные латексные гранулы, покрытые БСА (Sigma-Aldrich), при отношении клеток к гранулам 1:60 (приготовление БСА-гранул, см. Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383). После промывки в RPMI/10% ФТС и ресуспендирования в ФСБ/0,1% БСА (Sigma-Aldrich) опосредуемый сывороточным IgA человека фагоцитоз флуоресцентных латексных гранул (среднегеометрическая интенсивность флуоресценции использовалась для расчета фагоцитарного индекса в соответствии с Aleyd et al. J Immunol 2014; 192: 2374-2383) мембранным CD89 человека на *ex vivo* нейтрофильных гранулоцитах человека измеряли с использованием проточного цитометра (Fortessa; BD Biosciences).

Как показано на Фигуре 29, оба очищенных варианта блокирующего CD89/IgA и «с устранимым дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 дозозависимо ингибировали опосредуемый сывороточным IgA человека фагоцитоз в *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитах человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека, выделенных от трех здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

Эти результаты продемонстрировали, что варианты блокирующего CD89/IgA и «с устранимым дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 ингибировали опосредуемую сывороточным IgA человека фагоцитарную активность *ex vivo* первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих мембранный CD89 человека.

(с). Блокирование опосредуемой сывороточным IgA человека продукции лактоферрина из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека, с использованием вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7
5 VH3SQVL3 и VH3STVL3

Чтобы проанализировать биологическую активность очищенных вариантов блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7
10 VH3SQVL3 и VH3STVL3, определяли способность созданных блокирующих CD89/IgA химерных мышиных/человеческих антител к CD89 человека ингибировать продукцию лактоферрина из первичных нейтрофильных гранулоцитов человека, экспрессирующих CD89 человека.

Первичные нейтрофильные гранулоциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров (после информированного согласия) с использованием
15 градиентного центрифугирования Lymphoprep™ (Axis-Shield) с последующим лизисом эритроцитов в лизирующем буферном растворе NH₄Cl. Затем эти первичные нейтрофильные гранулоциты человека ресуспендировали при 2,0×10⁶ клеток/мл в RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФТС (Sigma-Aldrich), а затем 100 мкл гранулоцитов (т. е. 0,2×10⁶ клеток/лунку) инкубировали с титрованными (в
20 RPMI/10% ФТС) очищенными вариантами блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 в течение 20 минут при 4°C. Одновременно с этим титрованное (в RPMI/10% ФТС) очищенное изотипическое контрольное антитело IgG4 человека (Sigma-Aldrich) анализировали в качестве
25 отрицательного контроля. Кроме того, в качестве референсного анализировали титрованное (в RPMI/10% ФТС) очищенное химерное антитело к CD89 человека 10E7 (см. Пример 6). После этого (т. е. без промывки) 100 мкл этих клеток (т. е. 0,2×10⁶ клеток/лунку) добавляли в 96-луночные планшеты для ИФА с плоским дном (Nunc-Immuno MaxiSorp), которые предварительно покрывали либо 100 мкл/лунку очищенного
30 IgA человека (полученного из сыворотки) (MP Biomedicals) при 10 мкг/мл, либо 100 мкл/лунку БСА (используемого в качестве отрицательного контроля; Sigma-Aldrich) при 10 мкг/мл. После инкубации в течение 30 минут при 37°C супернатанты (180 мкл/лунку) собирали для удаления несвязанных гранулоцитов, и эти супернатанты использовали (после нескольких этапов очистки центрифугированием) для измерения уровней
35 продукции лактоферрина (использованного в качестве маркера дегрануляции; см. ниже).

Для сравнения клон МР8а коммерческого мышиноного антитела к CD89 человека анализировали параллельно, как описано в Примере 3 (d).

5 Продукцию лактоферрина измеряли в супернатантах первичных нейтрофильных гранулоцитов человека (представляющую степень дегрануляции), которые стимулировали связанным с планшетом сывороточным IgA человека (см. выше). Для этого 96-луночные
10 планшеты для ИФА с плоским дном (Nunc-Immuno MaxiSorp) покрывали 100 мкл/лунку кроличьих антител к лактоферрину человека (1:5000; Sigma-Aldrich) в течение 16-24 часов при 4-8°C. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты блокировали 200 мкл/лунку ФСБ/0,05% Tween 20/0,5% БСА (Sigma-Aldrich) в течение 1 часа при КТ.
15 Затем планшеты инкубировали со 100 мкл/лунку супернатанта в разведении 1:2 (в блокирующем буфере) в течение 1 часа при 37°C. После тщательной промывки в ФСБ/0,05% Tween 20 планшеты инкубировали с мечеными щелочной фосфатазой кроличьими детектирующими антителами к лактоферрину человека (1:2500; MP Biomedicals) в течение 1 часа при 37°C. После добавления Р-нитрофенилфосфата (Sigma-Aldrich) измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов (iMark; Bio-Rad). Очищенный лактоферрин человека (Sigma-Aldrich) использовали в качестве стандарта для расчета количества лактоферрина, высвобождаемого *ex vivo* нейтрофильными гранулоцитами человека, стимулированными сывороточным IgA человека.

20 Как показано на Фигуре 30, оба очищенных варианта блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 дозозависимо ингибировали опосредуемую сывороточным IgA человека продукцию лактоферрина *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими CD89 человека,
25 выделенными от пяти здоровых индивидуумов, хотя наблюдали некоторую вариацию между донорами.

Эти результаты продемонстрировали, что варианты блокирующего CD89/IgA и «с устраненным дезамидированием CDR2» гуманизированного моноклонального антитела IgG4/каппа к CD89 человека 10E7 VH3SQVL3 и VH3STVL3 ингибировали опосредуемую
30 IgA человека продукцию лактоферрина (маркера дегрануляции) *ex vivo* первичными нейтрофильными гранулоцитами человека, экспрессирующими мембранный CD89 человека.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аспект 1. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека (Fc α RI
35 человека) на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать

связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое индуцирует меньшую клеточную гибель в указанных клетках, экспрессирующих CD89 человека, по сравнению с антителом MIP8a.

5 Аспект 2. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое не снижает клеточную жизнеспособность указанных клеток более чем на 60% после инкубации в течение ночи при 37°C.

10 Аспект 3. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое не повышает экспрессию фосфатидилсерина указанных клеток более чем на 20% после инкубации в течение ночи при 37°C.

15 Аспект 4. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с рекомбинантной молекулой CD89 человека, в которой аминокислоты 22-46 CD89 человека заменены аминокислотами 22-46 CD89 яванской макаки.

20 Аспект 5. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 47-71 CD89 человека заменены аминокислотами 47-71 CD89 яванской макаки.

25 Аспект 6. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 72-96 CD89 человека заменены аминокислотами 72-96 CD89 яванской макаки.

30 Аспект 7. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и связывание которого не снижается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в

которой аминокислоты 97-121 CD89 человека заменены аминокислотами 97-121 CD89 яванской макаки.

5 Аспект 8. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и которое может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками, и которое связывается на 20% или меньше с химерной молекулой CD89, в которой аминокислоты 58; 59; 73; 74; 76; 106 и 107 CD89 человека заменены аминокислотами 58; 59; 73; 74; 76; 106 и 107, соответственно, CD89 яванской макаки.

10 Аспект 9. Антитело по любому из аспектов 1-8, характеризующееся тем, что указанные клетки представляют собой клетки HEK293F, экспрессирующие CD89 человека (депонированные под номером DSM ACC3341).

15 Аспект 10. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 29-31 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 32-34 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

20 Аспект 11. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

25 Аспект 12. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 45-47 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 48-50 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

30 Аспект 13. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

35

Аспект 14. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 69-71 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 72-74 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Аспект 15. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Аспект 16. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 77-79 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 80-82 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Аспект 17. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Аспект 18. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 53-55 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3, имеющей SEQ ID NO: 56-58 с 0, 1 или 2 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

Аспект 19. Антитело, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и переменную область легкой цепи с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 52 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1:

- 5 Аминокислотная последовательность полноразмерного CD89 человека (Swiss-Prot № P24071.1; 287 амк.)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIREAYLTQL
MIIKNSTYREIGRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGHYRFRYSDTLELVV
TGLYGKPFLSADRGLVLMPGENISLTCSSAHIPDFRFLAKEGELSLPQHQSGEHPANFSL
10 GPVDLNVSGIYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTDSIHQDYTTQNLIRMAVAGLVL
VALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

- Сигнальный пептид (аминокислотная последовательность 1-21), внеклеточный домен (аминокислотная последовательность 22-227), содержащий Ig-подобный домен EC1 (аминокислотная последовательность 22-121), короткую шарнирную область
15 (аминокислотная последовательность 122-125), Ig-подобный домен EC2 (аминокислотная последовательность 126-220) и проксимальную относительно мембраны «линкерную» область (аминокислотная последовательность 221-227), за которым следует трансмембранный домен (аминокислотная последовательность 228-246) и короткий цитоплазматический хвост (аминокислотная последовательность 247-287) в соответствии
20 с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970.

SEQ ID NO: 2:

Последовательность кДНК, кодирующая полноразмерный белок CD89 человека (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

- atggaccccaagcagaccaccctgctgtgcctggtgctgtgtctgggccagagaatccaggcccaggaaggcgactccccatgcccttc
25 atcagcgccaagagcagccccgtgatccccctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccatcagagaggcctacctgaccagct
gatgatcattaagaacagcacctaccgcgagatcggcagacggctgaagtctggaacgagacagacccccgagttcgtgatcgaccat
ggacgccaacaaggccggcagataccagtgtcagtaccggatcgccactaccggttccggtacagcgacaccctggaactggctgtga
ccggcctgtacggcaagcctttctgagcgcggatcggggactggtgctgatgcccggcgagaacatcagcctgacctgtagcagcgcc
cacatccccttcgacagattcagcctggcacaagagggcgagctgagcctgcctcagcatcagtctggcgagacccccgcaactttagc
30 ctgggccctgtggacctgaacgtgtccggcatctaccggtgctacggctggtacaaccggtccccctacctgtggtccttcccagcaacg
ctctggaactggtcgtgacagacagcatccaccaggactacaccaccagaacctgatccggatggccgtggctgggctggtgctggtgg
ctctgctggccattctggtggaaaactggcacagccacaccgacctgaacaagaggccaagcgcgatgtggccgagccttcttgagcc
agcagatgtgtcagccggcctgacctcgccagaacccttctgtgtgcaag

SEQ ID NO: 3:

Аминокислотная последовательность химерного FcR, содержащего EC1 из CD89 человека и EC2 из бычьего Fcγ2R (бычий TM и бычий IC)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIREAYLTQL
MIIKNSTYREIGRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGHYRFRYSDTLEL VV
5 TGEEPAGRLRDRPSLSVRPSVAPGENVTLLCQSGNRTDTFLLSKEGAAHRPLRLRSQD
QDGWYQAEFSLSPVTSAHGGTYRCYRSLSTNPYLLSQPSEPLALLVADYTMQNLIRMGL
AASVLLLLGILLCQARHDHGGAREAARS

10 Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21), химерный человеческий/бычий FcR внеклеточный домен (аминокислотная последовательность 22-232), состоящий из домена EC1 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 22-121) и домена EC2 из бычьего Fcγ2R (аминокислотная последовательность 122-232), трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост из бычьего Fcγ2R (аминокислотная последовательность 233-266).

15 SEQ ID NO: 4:

Аминокислотная последовательность химерного FcR, содержащего EC1 из CD89 человека и EC2 из бычьего Fcγ2R (TM человека и IC человека)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIREAYLTQL
MIIKNSTYREIGRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGHYRFRYSDTLEL VV
20 TGEEPAGRLRDRPSLSVRPSVAPGENVTLLCQSGNRTDTFLLSKEGAAHRPLRLRSQD
QDGWYQAEFSLSPVTSAHGGTYRCYRSLSTNPYLLSQPSEPLALLVADYTMQNLIRMA
VAGLVLVALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

25 Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21), химерный человеческий/бычий FcR внеклеточный домен (аминокислотная последовательность 22-232), состоящий из домена EC1 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 22-121) и домена EC2 из бычьего Fcγ2R (аминокислотная последовательность 122-232), трансмембранный домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность 233-251) и короткий цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная последовательность 252-292).

30 SEQ ID NO: 5:

Последовательность кДНК, кодирующая химерный FcR, содержащий EC1 из CD89 человека и EC2 из бычьего Fcγ2R (бычий TM и бычий IC; оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggacccaagcagaccacactgctgtgcctggtgctgtgtctcggccagagaatccaagctcaagagggcgactccccatgcctttcat
35 cagcgccaagagcagccctgtgatccctctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccatcagagaggcctacctgacacagctga

tgatcattaagaacagcacctaccgcgagatcggcagacggctgaagttctggaacgagacagacccccgagttcgtgatcgaccacatgg
acgccaacaaggccggcagataaccagtgtcagtaccggatcggccactaccggttcagatacagcgacaccctggaactggtggtcacc
ggcgaagaacctgctggcagactgagagatagaccagcctgtctgtcggccttctccttctgttcccctggcgagaatgtgacctgct
ctgtcagagcggcaaccggaccgataccttctgtgtctaaagaaggcggcgtcacagaccctgagactgagatcacaggaccagg
5 acggatggtatcaggccgagttctctgtgagcccagtacatctgtctacggcggcacctacagatgctacagaagcctgagcacaacc
cctatctgtgagccagcctagcagcctctggctctgtggtggccgattacaccatgcagaacctgatcagaatggcctcgccgctct
gttctgtgctgtggtggaatcctgtgtgtcaagccagacacgatcacggcggagccagagaagctgccagatct

SEQ ID NO: 6:

Последовательность кДНК, кодирующая химерный FcR, содержащий EC1 из CD89
10 человека и EC2 из бычьего Fcγ2R (TM человека и IC человека; оптимизированная для
экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagcagaccacactgctgtgcctggtgctgtgtctggccagagaatccaagctcaagaggcgacttcccatgccttcat
cagcgccaagagcagccctgtgatccctctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccatcagagaggcctacctgacacagctga
tgatcattaagaacagcacctaccgcgagatcggcagacggctgaagttctggaacgagacagacccccgagttcgtgatcgaccacatgg
15 acgccaacaaggccggcagataaccagtgtcagtaccggatcggccactaccggttcagatacagcgacaccctggaactggtggtcacc
ggcgaagaacctgctggcagactgagagatagaccagcctgtctgtcggccttctccttctgttcccctggcgagaatgtgacctgct
ctgtcagagcggcaaccggaccgataccttctgtgtctaaagaaggcggcgtcacagaccctgagactgagatcacaggaccagg
acggatggtatcaggccgagttctctgtgagcccagtacatctgtctacggcggcacctacagatgctacagaagcctgagcacaacc
cctatctgtgagccagcctagcagcctctggctctgtggtggccgattacaccatgcagaacctgatcagaatggcctggtggccgact
20 ggtgctggtgactgctggctatcctggtggaactggcagaccacagccctgaacaagaggcttctgccgacgtcggcagacc
ttctggagtcagcagatgtgtcagccggcctgacctcggcagaacacctagcgtgtgcaag

SEQ ID NO: 7:

Аминокислотная последовательность химерного FcR, содержащего EC1 из бычьего Fcγ2R
и EC2 из CD89 человека (TM человека и IC человека)

25 MAPTLPALCLGLSVGLRTQVQAGTFPKPIIWAEPSSVVPLGSSVTILCQGPPNTKSFSLN
KEGDSTPWNIHPSLEPWDKANFFISNVREQQAGR YHC SHFIGVNWSEPLEDLLVAGL
YGKPFLSADRGLVLMGENISLTCSSAHIPDRFSLAKEGELSLPQHQSGEHPANFSLGPV
DLNVS GIYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTDSIHQDYTTQNLIRMAVAGLVLVAL
LAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

30 Сигнальный пептид из бычьего Fcγ2R (аминокислотная последовательность 1-23),
химерный бычий/человеческий FcR внеклеточный домен (аминокислотная
последовательность 24-225), состоящий из домена EC1 из бычьего Fcγ2R (аминокислотная
последовательность 24-119), короткой шарнирной области из CD89 человека
(аминокислотная последовательность 120-123), домена EC2 из CD89 человека
35 (аминокислотная последовательность 124-218) и проксимальной относительно мембраны

«линкерной» области из CD89 человека (аминокислотная последовательность 219-225), за которым следует трансмембранный домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность 226-244) и короткий цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная последовательность 245-285) в соответствии с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970.

SEQ ID NO: 8

Последовательность кДНК, кодирующая химерный FcR, химерный FcR, содержащий EC1 бычьего Fcγ2R и EC2 CD89 человека (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

10 atggccctacactgcctgctctgtctgtctgggactgtctgtgggcctgagaacacaggtgcaggccggcacattccccaagcctatcat
ttgggccgagcctagctctgttggtgcctctgggaagcagcgtgaccatcctgtgtcaggccctccaaacaccaagagcttcagcctgaac
aaagagggcgacagcacccttggaacattcacctagcctggaaccttgggacaaagccaactcttcatcagcaacgtgcgcgagcag
caggccggaagataccactgctctcacttcatcggagtgaattggagcagagcccagcagcctctggatctgcttggctggcctgtacg
gcaagcctttctgtctgccgatagaggcctggctgtatgcccggcgagaatatcagcctgacctgtagcagcgtcacatccccttcgac
15 agattctccctggccaaagaaggcgagctgagcctgcctcagcatcagcttggcgaacaccccgccaactttctctggcccttgggacct
gaacgtgtccggcatctacagatgctacggctgggtacaatcggagccctacctgtgttcttcccagcaatgcctggaactggtggtca
ccgatagcatccaccaggactacaccacacagaacctgatcagaatggccgtggccggactggtgctggtgactgctggctattctggt
ggaaaactggcacagccacaccgctctcaacaagaagcctctgccgacgtgccgagccttctggagtgcagagatgtgtcagcccgg
cctgaccttcgccagaacacctagcgtgtgcaag

20 SEQ ID NO: 9:

Аминокислотная последовательность полноразмерного бычьего Fcγ2R (Swiss-Prot № Q28109; 264 амк.)

MARTLPALLCLGLSVGLRTQVQAGTFPKPIIWAEPSSVVPLGSSVTILCQGPPNTKSFSLN
KEGDSTPWNIIHPSLEPWDKANFFISNVREQQAGRYHC SHFIGVNWSEPLEDLLVAGE
25 EPAGRLRDRPSLSVRPSVAPGENVTLLCQSGNRTDTFLLSKEGAAHRPLRLRSQDQDG
WYQAEFSLSPVTSAHGGTYRCYRSLSTNPYLLSQPSEPLALLVADYTMQNLIRMGLAAS
VLLLIGILLCQARHDHGGAREAAARS

Сигнальный пептид (аминокислотная последовательность 1-23), внеклеточный домен (аминокислотная последовательность 24-230), содержащий Ig-подобный домен EC1 (аминокислотная последовательность 24-119) и Ig-подобный домен EC2 (аминокислотная последовательность 120-230), за которым следует трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост (аминокислотная последовательность 231-264).

SEQ ID NO: 10:

35 Последовательность кДНК, кодирующая полноразмерный бычий белок Fcγ2R (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggccctacactgcctgctctgctgtctgggactgtctgtgggcctgagaacacaggtgcaggccggcacattcccaagcctatcat
ttggccgagcctagctctgtggtgcctctgggaagcagcgtgaccatcctgtgtcagggccctccaaaccaagagcttcagcctgaac
aaagagggcgacagcacccttggaaattcaccctagcctggaaccttgggacaaagccaacttctcatcagcaacgtgcgcgagcag
caggccggaagataccactgctctcacttcatcggagtggaattggagcagcccagcagcctctggatctgctgttgctggcgaagaac
5 cagccggcagactgagatagaccctctctgagtgtcggccctctcctctgtgcccctggcgaaaatgtgacctgctgtgccagagc
ggcaacaggaccgataccttctgctgagcaaagaaggcggcgtcacagaccctgagactgagatcacaggaccaggacggatggt
atcaggccgagttcagcctgtctctgtgacatctgctcacggcggcacctacagatgctacagaagcctgagcacaaccctacctgct
gtcccagccttctgagccttggctctgctggtggccgactacaccatgcagaacctgatcagaatgggacctgccgctctgttctgctgct
gctgggaatcctgctctgtcagccagacacgatcatggcggagccagagaagccgcccagatct

10 SEQ ID NO: 11:

Аминокислотная последовательность полноразмерного CD89 яванской макаки
(референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1; 287 амк.)

MDPKETLLCLVLCLGQRIQAQEGNFSTPFISTRSSPVVPWGGSVRIQCQAIPDAYLIWL
MMLKNSTYEKRDEKLGFWNDTTPEFVIDHMDANKAGRYRCRYRIGLSRFRYSDTLELV
15 VTGLYGKPSLSVDRGPVLMGENISVTCSSAHIPFDRFSLAKEGELSLPQHQSGEHPANFS
LGPVDLNVSGSYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTD SINRDYTTQNLIRMAMAGLV
LVALLAILVENWHSKALNKEASADVAEPSWSHQMCQPGWTFARTPSVCK

SEQ ID NO: 12:

20 Последовательность кДНК, кодирующая полноразмерный CD89 яванской макаки
(оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagaaccaccctgctgtgcctggctgtgtctgggcca gagaatccaggcccaggaaggcaacttcagcacccttc
atcagcaccagatccagccccgtgctgcttggggaggctctgtcggattcagtgccaggccatccccgacgcctacctgatctggctga
tgatgctgaagaacagcacctacgagaagcgggacgagaagctgggcttctggaacgacaccacccccgagttcgtgatcgaccatg
gacgccaacaaggccggcagataccggtgccggtacagaatcggcctgagccggttcagatacagcagaccctggaactgctcgtga
25 ccggcctgtacggcaagcctagcctgtcgtgatagaggccccgtgctgatgcccggcgagaacatcagcgtgacctgtacagcggc
cacatcccccttcagacagattcagcctggccaagagggcgagctgagcctgacctcagcatcagctggcgagcaccgccaaacttagc
ctggccctgtggacctgaacgtgtccggcagctacagatgctacggctggtaaccggctccccctacctgtggtccttcccagcaacg
ctctggaactggtcgtgacagacagcatcaaccgggactacaccacccagaacctgatccggatggctatggccggactggtgctggtgg
ccctgctggccatcctggtgaaaactggcacagccacaaggccctgaacaagaggccagcggcggatgtggccgagccttctggagc
30 caccagatgtgtcagcccggctggaccttgcgagaaccccttctgtgtgcaag

SEQ ID NO: 13:

Аминокислотная последовательность химерного CD89, полученного путем замены части
EC1 CD89 человека (Gln22–Lys46) частью EC1 из CD89 яванской макаки (Gln22–Arg46)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGNFSTPFISTRSSPVVPWGGSVRIQCQAIREAYLTQL
35 MIIKNSTYREIGRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGHYRFRYSDTLELVV

TGLYGKPFLSADRGLVLMPTGENISLTCSSAHIPFDRFSLAKEGELSLPQHQSGENHPANFSL
GPVDLNVSGIYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTDSIHQDYTTQNLIRMAVAGLVL
VALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21),
5 химерный внеклеточный домен CD89 человека/яванской макаки (аминокислотная
последовательность 22-227), содержащий часть Ig-подобного домена EC1 из CD89
яванской макаки (аминокислотная последовательность 22-46; референсная
последовательность NCBI: XP_005590398.1) и часть Ig-подобного домена EC1 из CD89
человека (аминокислотная последовательность 47-121; Swiss-Prot № P24071.1), короткую
10 шарнирную область из CD89 человека (аминокислотная последовательность 122-125), Ig-
подобный домен EC2 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 126-220) и
проксимальную относительно мембраны «линкерную» область из CD89 человека
(аминокислотная последовательность 221-227), за которым следует трансмембранный
домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность 228-246) и короткий
15 цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная последовательность 247-
287) в соответствии с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970.

SEQ ID NO: 14:

Последовательность кДНК, кодирующая химерный CD89, полученный путем замены
части EC1 из CD89 человека (Gln22-Lys46) частью EC1 из CD89 яванской макаки (**Gln22-**
20 **Arg46**) (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagcagaccacactgctgtgcctggctgtgtctcggccagagaatccaggctcaagagggcaacttcagcaccctttca
tcagcaccagatctagcccgtggtgccttggggcggctctgttagaatccagtgccaggccatcagagagggcctacctgacacagctgat
gatcattaagaacagcacctaccgagatcggcagacggctgaagtctggaacgagacagacaccccgagttcgtgatcgaccacatgg
acgccaacaagccggcagataaccagtgtcagtaccggatcggccactaccggttcagatacagcgacaccctggaactggtggtcacc
25 ggctgtacggcaagcctttctgagcgcgatagaggcctggtcctgatgcctggcgagaacatcagcctgacctgtagcagcgtcaca
tcccctcgacagattcagcctggccaagagggcgagctgtctctgcctcagcatcagtctggcgagcaccgcccaatcttctctgggc
cctgtggacctgaacgtgtccggcatctacagatgctacggctggtacaatcggagcccctacctgtggtctttcccagcaatgcctcga
actggtcgtgaccgatagcatccaccaggactacaccacacagaacctgatcagaatggccgtggccggactggtgctggtgctctgctg
gctattctggtggaactggcacagccacacagccctgaacaagaggcttctgccgacgtcggcagccttctggagtcagcagatgt
30 gtcagcccgccctgacctcgccagaacacctaagcgtgtgcaag

SEQ ID NO: 15:

Аминокислотная последовательность химерного CD89, полученного путем замены части
EC1 из CD89 человека (Ile47-Ile71) частью EC1 из CD89 яванской макаки (**Ile47-Arg71**)
MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIPDAYLIWL
35 MMLKNSTYEKRGRRLLKFWNETDPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGHYRFRYSDTLEL

VVTGLYGKPFSLADRGLVLMPGENISLTCSSAHIPFDRFSLAKEGELSLPQHQSGENPAN
FSLGPVDLNVSGIYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTDSDIHQDYTTQNLIRMAVAGL
VLVALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21),
5 химерный внеклеточный домен CD89 человека/яванской макаки (аминокислотная
последовательность 22-227), содержащий часть Ig-подобного домена EC1 из CD89
человека (аминокислотная последовательность 22-46; Swiss-Prot № P24071.1), часть Ig-
подобного домена EC1 из CD89 яванской макаки (аминокислотная последовательность
47-71; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1) и часть Ig-подобного
10 домена EC1 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 48-121; Swiss-Prot №
P24071.1), короткую шарнирную область из CD89 человека (аминокислотная
последовательность 122-125), Ig-подобный домен EC2 из CD89 человека (аминокислотная
последовательность 126-220) и проксимальную относительно мембраны «линкерную»
область из CD89 человека (аминокислотная последовательность 221-227), за которым
15 следует трансмембранный домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность
228-246) и короткий цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная
последовательность 247-287) в соответствии с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-
27970.

SEQ ID NO: 16:

20 Последовательность кДНК, кодирующая химерный CD89, полученный путем замены
части EC1 из CD89 человека (Пле47–Пле71) частью EC1 из CD89 яванской макаки (**Пле47–
Arg71**) (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagcagaccacactgctgtgcctggtgctgtgtctcggccagagaatccaagctcaagagggcgacttccccatgcctttcat
cagcgccaagagcagccctgtgatccctctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccattcctgacgcctacctgatctggctgatg
25 atgctgaagaacagcacctacgagaagagaggcagacggctgaagttctggaacgagacagacccccgagttcgtgatcgaccacatgg
acgccaacaagggccgagatacagtgctacaccggatcggccactaccggttcagatacagcgacacccctggaactggtggtcacc
ggcctgtacggcaagccttttctgtctgccgatagaggactgggtgctgatgcccggcgagaacatcagcctgacctgtagctctgctcat
ccccctcgacagattcagcctggccaagaaggcgagctgagcctgcctcagcatcagctctggcgaacaccccgccaacttttctgggc
cctgtggacctgaacgtgtccggcatctacagatgctacggctggtacaatcggagcccctacctgtggtctttcccagcaatgccctcga
30 actggtcgtgaccgatagcatccaccaggactacaccacacagaacctgatcagaatggccgtggccggcctggttctggttctgctgctg
gctattctggtggaaaactggcacagccacacagccctgaacaagaggcttctgccgacgtcggcagccttctggagtcagcagatgt
gtcagcccggcctgacctcgccagaacacctagcgtgtgcaag

SEQ ID NO: 17:

Аминокислотная последовательность химерного CD89, полученного путем замены части EC1 из CD89 человека (Gly72–Gly96) частью EC1 из CD89 яванской макаки (**Asp72–Gly96**)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIREAYLTQL
5 MIKNSTYREIDEKLGFWNDTTPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGHYRFYSDTLELVV
TGLYGKPFLSADRGLVLMPEGENISLTCSSAHIPDFRFLAKEGELSLPQHQSGENPANFSL
GPVDLNVSGIYRCYGWYNRSPYLWSFSPNALELVVTDSIHQDYTTQNLIRMAVAGLVL
VALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

10 Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21),
химерный внеклеточный домен CD89 человека/яванской макаки (аминокислотная
последовательность 22-227), содержащий часть Ig-подобного домена EC1 из CD89
человека (аминокислотная последовательность 22-71; Swiss-Prot № P24071.1), часть Ig-
подобного домена EC1 из CD89 яванской макаки (аминокислотная последовательность
15 72-96; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1) и часть Ig-подобного
домена EC1 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 97-121; Swiss-Prot №
P24071.1), короткую шарнирную область из CD89 человека (аминокислотная
последовательность 122-125), Ig-подобный домен EC2 из CD89 человека (аминокислотная
последовательность 126-220) и проксимальную относительно мембраны «линкерную»
20 область из CD89 человека (аминокислотная последовательность 221-227), за которым
следует трансмембранный домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность
228-246) и короткий цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная
последовательность 247-287) в соответствии с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-
27970.

SEQ ID NO: 18:

25 Последовательность кДНК, кодирующая химерный CD89, полученный путем замены
части EC1 из CD89 человека (Gly72–Gly96) частью EC1 из CD89 яванской макаки (**Asp72–
Gly96**) (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagcagaccacactgctgtgcctggtgctgtgtctcggccagagaatccaagctcaagagggcgacttccccatgcctttcat
cagcgccaagagcagccctgtgatccctctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccatcagagaggcctacctgacacagctga
30 tgatcattaagaacagcacctaccgagatcagcagagaagctcggcttctggaacgacaccacacctgagttcgtgatcgaccacatgga
cgccaacaaggccggcagataccagtgtagtaccggatcggccactaccggttcagatacagcgacaccctggaactggtggtcaccg
gcctgtacggcaagcctttctgtctgccgatagaggactggtgctgatgcccggcgagaacatcagcctgacctgtgctctgctcatc
cccttcgacagattcagcctggccaagaaggcagctgagcctgcctcagcatcagcttggcgaacaccccgcaactttctctggggc
ctgtggacctgaacgtgtccggcatctacagatgctacggctggtacaatcggagcccctacctgtggtctttcccagcaatgcctcgaa
35 ctggtcgtgaccgatagcatccaccaggactacaccacagaacctgatcagaatggccgtggccggcctggttctggtgctctgctgg

ctattctggtggaaaactggcacagccacacagccctgaacaagaggcttctgccgacgtgccgagccttcttgagtcagcagatgtg
tcagcccggcctgaccttcgccagaacacctagcgtgtgcaag

SEQ ID NO: 19:

Аминокислотная последовательность химерного CD89, полученного путем замены части

5 EC1 из CD89 человека (Arg97-Gly121) частью EC1 из CD89 яванской макаки (**Arg97-Gly121**)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIREAYLTQL
MIIKNSTYREIGRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAGRYRCRYRIGLSRFRYSDTLELVVT
GLYGKPFLSADRGLVLMPGENISLTCSSAHIPFDRFSLAKEGELSLPQHQSGEHPANFSLG
10 PVDLNVSGIYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTDSIHQDYTTQNLIRMAVAGLVLV
ALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21),

химерный внеклеточный домен CD89 человека/яванской макаки (аминокислотная
последовательность 22-227), содержащий часть Ig-подобного домена EC1 из CD89

15 человека (аминокислотная последовательность 22-96; Swiss-Prot № P24071.1) и часть Ig-

подобного домена EC1 из CD89 яванской макаки (аминокислотная последовательность

97-121; референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1), короткую шарнирную

область из CD89 человека (аминокислотная последовательность 122-125), Ig-подобный

домен EC2 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 126-220) и

20 проксимальную относительно мембраны «линкерную» область из CD89 человека

(аминокислотная последовательность 221-227), за которым следует трансмембранный

домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность 228-246) и короткий

цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная последовательность 247-

287) в соответствии с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970.

25 SEQ ID NO: 20: последовательность кДНК, кодирующая химерный CD89, полученный

путем замены части EC1 из CD89 человека (Arg97-Gly121) частью EC1 из CD89 яванской

макаки (**Arg97-Gly121**) (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagcagaccacactgctgtgcctggtgctgtgtctcggccagagaatccaagctcaagagggcgacttccccatgcctttcat

cagcgccaagagcagccctgtgatccctctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccatcagagaggcctacctgacacagctga

30 tgatcattaagaacagcacctaccgagatcggcagacggctgaagttctggaacgagacagacccccgagttcgtgatcgaccatgg

acgccaacaagggcggcagataccggtgcagatacagaatcggcctgagccggttccggtacagcgatacactggaactggtggtcacc

ggcctgtacggcaagcctttctgagcgcgatagaggactggtgctgatccccggcgagaacatcagcctgacctgtgctctgctcaca

tcccttcgacagattcagcctggccaagaaggcgagctgagcctgcctcagcatcagctggcgaacacccccgcaactttctctggg

ccctgtggacctgaacgtgtccggcatctacagatgctacggctggtacaatcggagcccctacctgtggtctttcccagcaatgcctgg

35 aactcgtcgtgaccgatagcatccaccaggactacaccacacagaacctgatcagaatggccgtggccggcctggttctggtgctctgct

ggctattctggtggaactggcacagccacacagccctgaacaaagaggcttctgccgacgtgccgagccttctggagtcagcagat
gtgtcagccccggcctgaccttcgccagaacacctaagcgtgtgcaag

SEQ ID NO: 21:

Аминокислотная последовательность химерного CD89, полученного путем замены
5 аминокислотных остатков, контактирующих с IgA человека, в пределах части EC1 из
CD89 человека (Thr58, Gln59, Arg73, Arg74, Lys76, His106 и Tyr107) реципрокными
аминокислотами из части EC1 из CD89 яванской макаки (**Ile58, Trp59, Glu73, Lys74,
Gly76, Leu106 и Ser107**)

MDPKQTLLCLVLCLGQRIQAQEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVKIQCQAIREAYLIWL
10 MIKNSTYREIGEKLGFWNEDPEFVIDHMDANKAGRYQCQYRIGLSRFYSDTLELVV
TGLYGKPFLSADRGLVMPGENISLTCSSAHIPDFRFLAKEGELSLPQHQSGENHPANFSL
GPVDLNVSGIYRCYGWYNRSPYLWSFPSNALELVVTDSIHQDYTTQNLIRMAVAGLVL
VALLAILVENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK

Сигнальный пептид из CD89 человека (аминокислотная последовательность 1-21),
15 химерный внеклеточный домен CD89 человека/яванской макаки (аминокислотная
последовательность 22-227), содержащий Ig-подобный домен EC1 из CD89 человека
(аминокислотная последовательность 22-121; Swiss-Prot № P24071.1), за исключением
Ile58, Trp59, Glu73, Lys74, Gly76, Leu106 и Ser107 из Ig-подобного домена EC1 CD89
яванской макаки (референсная последовательность NCBI: XP_005590398.1), короткую
20 шарнирную область из CD89 человека (аминокислотная последовательность 122-125), Ig-
подобный домен EC2 из CD89 человека (аминокислотная последовательность 126-220) и
проксимальную относительно мембраны «линкерную» область из CD89 человека
(аминокислотная последовательность 221-227), за которым следует трансмембранный
домен из CD89 человека (аминокислотная последовательность 228-246) и короткий
25 цитоплазматический хвост из CD89 человека (аминокислотная последовательность 247-
287) в соответствии с Ding et al. J Biol Chem 2003; 278:27966-27970.

SEQ ID NO: 22:

Последовательность кДНК, кодирующая химерный CD89, полученный путем замены
аминокислотных остатков, контактирующих с IgA человека, в пределах части EC1 из
30 CD89 человека (Thr58, Gln59, Arg73, Arg74, Lys76, His106 и Tyr107) реципрокными
аминокислотами из части EC1 из CD89 яванской макаки (**Ile58, Trp59, Glu73, Lys74,
Gly76, Leu106 и Ser107**) (оптимизированная для экспрессии у млекопитающих)

atggaccccaagcagaccacactgctgtgcctggtgctgtgtctcggccagagaatccaagctcaagagggcgacttccccatgccttcat
cagcgccaagagcagccctgtgatccctctggatggcagcgtgaagatccagtgccaggccatcagagaggcctacctgatctggctgat
35 gatcattaagaacagcacctaccgcgagatcggcgagaagctcggcttctggaacgagacagacccccgagttcgtgatcaccacatgg

acccaacaaggccggcagataccagtgtcagtaccggatcggcctgagccggttcagatacagcgataccctggaactggtggtcacc
ggcctgtacggcaagccttttctgtctgccgatagaggactggtgctgatgccggcgagaacatcagcctgacctgtgctctgctcacat
ccccttcgacagattcagcctggccaaagaaggcgaagctgagcctgcctcagcatcagtctggcgaacaccccgccaacttttctgtggc
cctgtggacctgaacgtgtccggcatctacagatgctacggctgtacaatcggagcccctacctgtggtctttcccagcaatgccctcga
5 actggtcgtgaccgatagcatccaccaggactacaccacacagaacctgatcagaatggccgtggccggcctggttctggttctgctgctg
gctattctggtggaaaactggcacagccacacagcctgaacaaagaggcttctgccgacgtgccgagccttctggagtcagcagatgt
gtcagcccggcctgaccttcgccagaacacctagcgtgtgcaag

SEQ ID NO: 23:

10 Аминокислотная последовательность I в пределах части EC1 CD89 человека (Gln22–
Lys46)

QEGDFPMPFISAKSSPVIPLDGSVK

SEQ ID NO: 24:

Аминокислотная последовательность II в пределах части EC1 CD89 человека (Ile47–Ile71)

IQCQAIREAYLTQLMIKNSTYREI

15 SEQ ID NO: 25:

Аминокислотная последовательность III в пределах части EC1 CD89 человека (Gly72–
Gly96)

GRRLKFWNETDPEFVIDHMDANKAG

SEQ ID NO: 26:

20 Аминокислотная последовательность IV в пределах части EC1 CD89 человека (Arg97–
Gly121)

RYQCQYRIGHYRFRYSDTLELVVTG

SEQ ID NO: 27:

25 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQTPDKRLEWVATMHSGGTY
TYYPDNVKGRFTISRDNKNNLYLQMSSLRSEDAMYYCARETGLYDGLFDLFWGQGT
TLTVSS

SEQ ID NO: 28:

30 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 8F3

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKTISKYLAWYQEKPGKTNMLLIYSGSTLQSGVPSR
FSGSGSGTDFLTISLLEPEDLAMYYCQQHDEYPWTFGGGTKLEIK

35 **Области, определяющие комплементарность (CDR),** мышинного антитела,
специфичного в отношении CD89 человека, 8F3: SEQ ID NO: 29-34

- SEQ ID NO: 29:
Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 8F3
NYGMS
- SEQ ID NO: 30:
5 Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 8F3
TMHSGGTYTYYPDNVKG
- SEQ ID NO: 31:
Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 8F3
ETGLYDGLFDF
- 10 SEQ ID NO: 32:
Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 8F3
RASKTISKYLA
- SEQ ID NO: 33:
Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 8F3
15 SGSTLQS
- SEQ ID NO: 34:
Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 8F3
QQHDEYPWT
- SEQ ID NO: 35:
20 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 9H7
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKNYGMNWVKQAPGKGLKWMWINTYTG
PTHTDDFKGRFVFSLETSASTAYLQINNLNEDTATYFCARWGLGTTEEAARDYWGQG
TTLTVSS
- 25 SEQ ID NO: 36:
Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 9H7
DVVMTQTPLTSLVTIGQPASMSCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKSLIYLVSKQ
DSGVPDRFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYYCWQGTTFPQTFGGGKLEIK
- 30 **Области, определяющие комплементарность (CDR),** мышинного антитела,
специфичного в отношении CD89 человека, 9H7: SEQ ID NO: 37-42
- SEQ ID NO: 37:
Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 9H7
NYGMN
- 35 SEQ ID NO: 38:

- Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 9H7
WINTYTGEPHTHTDDFKG
SEQ ID NO: 39:
- Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 9H7
5 WGLGTTEEAARDY
SEQ ID NO: 40:
- Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 9H7
KSSQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 41:
- 10 Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 9H7
LVSKQDS
SEQ ID NO: 42:
- Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 9H7
WQGTHFPQT
- 15 SEQ ID NO: 43:
- Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 10E7
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGLTFSSYGMWVRQTPDKRLELVATINGNGDITY
YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARDYDYDYAMDYWGQGTSVT
- 20 VSS
SEQ ID NO: 44:
- Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 10E7
DIQMTQSTSSLSASLGDSVTISCRASQDIINYNLWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSR
- 25 FSGSGSGTEYSLTVSNLEKEDIATYFCQQGKTLPLYTFGGGTKLEIK
- Области, определяющие комплементарность (CDR), мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 10E7: SEQ ID NO: 45-50
SEQ ID NO: 45:
- Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 10E7
- 30 SYGMS
SEQ ID NO: 46:
- Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 10E7
TINGNGDITYYPDSVKG
SEQ ID NO: 47:
- 35 Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 10E7

DYDYDYAMDY

SEQ ID NO: 48:

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 10E7

RASQDIINYLN

5 SEQ ID NO: 49:

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 10E7

YTSRLHS

SEQ ID NO: 50:

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 10E7

10 QQGKTLPYT

SEQ ID NO: 51:

Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 16D6

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSAN

15 YNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTFEDSAVYYCAKGFSPYYYAMDYWGQGTS

VTVSS

SEQ ID NO: 52:

Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 16D6

20 EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSETSPKPWIYGTSKSLASGVPV

RFGSGSGTSYSLTISNMEAEDAATYYCQQWSSFPLTFGGGKLEIK

Области, определяющие комплементарность (CDR), мышинового антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 16D6: SEQ ID NO: 53-58

SEQ ID NO: 53:

25 Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 16D6

TYWIE

SEQ ID NO: 54:

Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 16D6

EILPGSGSANYNEKFKG

30 SEQ ID NO: 55:

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 16D6

GFGSPYYYAMDY

SEQ ID NO: 56:

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 16D6

35 SVSSSISSSNLH

- SEQ ID NO: 57:
Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 16D6
GTSKLAS
- 5 SEQ ID NO: 58:
Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 16D6
QQWSSFPLT
- SEQ ID NO: 59:
Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 26D6
- 10 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTLTKYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTG
PTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCASLPLFGRDSFAYWGQGT
LVSA
- SEQ ID NO: 60:
Консенсусная аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 26D6
- 15 DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQVTHFPQTFGGGTKLEIK
- Области, определяющие комплементарность (CDR), мышинного антитела, специфичного в
отношении CD89 человека, 26D6: SEQ ID NO: 61-66
- 20 SEQ ID NO: 61:
Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 26D6
KYGMN
- SEQ ID NO: 62:
Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 26D6
- 25 WINTYTGEPYADDFKG
- SEQ ID NO: 63:
Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 26D6
LPLFGRDSFAY
- SEQ ID NO: 64:
Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 26D6
- 30 KSSQSLDSDGKTYLN
- SEQ ID NO: 65:
Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 26D6
LVSKLDS
- 35 SEQ ID NO: 66:

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 26D6

WQVTHFPQT

SEQ ID NO: 67:

5 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 20B4

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGIIWAGGSTSY
NSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMY YCARDHYDLFA YWGQGT LVTVSA
SEQ ID NO: 68:

10 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 20B4

DILMTQSPSSMSVSLGDTV SITCHASQDISRNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLEDGVPS
RFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPRTFGGGTKLEIK

Области, определяющие комплементарность (CDR), мышинного антитела, специфичного в
отношении CD89 человека, 20B4: SEQ ID NO: 69-74

15 SEQ ID NO: 69:

Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 20B4
SYGVH

SEQ ID NO: 70:

20 Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 20B4
IIWAGGSTSYNSALMS

SEQ ID NO: 71:

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 20B4
DHYDLFA Y

SEQ ID NO: 72:

25 Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 20B4
HASQDISRNIG

SEQ ID NO: 73:

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 20B4
HGTNLED

30 SEQ ID NO: 74:

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 20B4
VQYAQFPRT

SEQ ID NO: 75:

35 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
мышинного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 30C7

QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYFTDYVMHWVKQSHAKSLEWIGVISTYSGNT
NYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARESDGYFFDYWGQGTTLT
VSS

SEQ ID NO: 76:

- 5 Консенсусная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышиноного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 30C7

DIVMSQSPSSLA VSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLMYTFGGGGTKLEIK

- 10 Области, определяющие комплементарность (CDR), мышиноного антитела, специфичного в отношении CD89 человека, 30C7: SEQ ID NO: 77-82

SEQ ID NO: 77:

Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи 30C7

DYVMH

SEQ ID NO: 78:

- 15 Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи 30C7

VISTYSGNTNYNQKFKG

SEQ ID NO: 79:

Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи 30C7

ESDGYFFDY

- 20 SEQ ID NO: 80:

Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи 30C7

KSSQSLLNSRTRKKNYLA

SEQ ID NO: 81:

Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи 30C7

- 25 WASTRES

SEQ ID NO: 82:

Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи 30C7

KQSYNLMYT

SEQ ID NO: 83:

- 30 Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VH 8F3/человеческую тяжелую цепь IgG4

atggagctgggcctgagctggattttctgctggccatcctgaagggcgtgcagtgccaagtgcagctggtgaatctggcggcggactgg

ftaagcctggcggatctctgaagctgagctgtgccccagcggctcacctcagcaattacggcatgagctgggtccgacagaccctga

caagagactggaatgggtcgccacaatgcacagcggcggcacctacactatcccgacaacgtgaagggcagattcaccatcagcc

- 35 gggacaacgccaaagaacaacctgtacctgcagatgagcagcctgcggagcagggataccgccatgtactactgcccagagaaccgg

ctgtacgacggcctgttcgattttggggccagggcaccacactgaccgtgtctagcgcctctacaagggccttagcgtgtccctctgg
ctcctttagcagaagcaccagcagcttacagccgctctgggctgtctggcaaggactactttcccagcctgtgacagtgtcctggaac
tctggcgtctgacaagcggcgtgcacacattccagccgtgtgcaaacagcggcctgtattctctgagcagcgtggtcacagtgccca
gctctagcctgggaccaagacctacacatgcaatgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagcgcgtggaatctaagtac
5 ggcctcctgtctccatgtcctgcacctgagtttctggcggaccctccgtgttctcttccaaagcctaaggacacctgatgatcag
cagaacctgaagtacctgcgtggtggtagctttccaagaggacctgaggtgcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagt
gcacaatgccaagaccaagcctagagaggaacagtcaacagcacctacagagtgggtgtccgtgctgacagtgtgcaccaggattggct
gaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagcc
aagagaaccccaggtgtacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggttaagggcttcta
10 cccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctctgtgctggacagcagcggct
catttctctgtacagcagcgtgacctggacaagagcagatggcaagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgc
acaacctacaccagaagtctctgagcctgtctctgggcaag

SEQ ID NO: 84:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VH 10E7/человеческую
15 тяжелую цепь IgG4

atggagctgggctgagctggattttctgtggccatcctgaaggcgtgcagtgcgaaagtgcagctggtgaatctggcggaggactgg
ttcagcctggcggatcttgaagctgtctgtgccgctctggcctgacctttagcagctacggcatgagctgggtccgacagaccctgac
aagagactggaactggtggccacaatcaacggcaacggcgacatcacctactatcccagacagcgtgaagggcagattaccatcagccg
ggacaacgccaagaacacctgtacctgcagatgagcagcctgaagtcaggacaccgccatgtactactgcccagagactacgact
20 acgattacgctatggactactggggccagggcaccagcgtgacagttagctctgcctctacaagggccttagcgtgtccctctggctcct
ttagcagaagcaccagcagcttacagccgctctgggctgtctggcaaggactactttcccagcctgtgaccgtgtcctggaattctgg
cgctctgacaagcggcgtgcacaccttccagctgtgtgcaaacgagcggcctgtactctctgagcagcgtggtcacagtgcctagctcta
gcctgggaccaagacctacacctgtaatgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagcgcgtggaatctaagtacggcct
cctgtcctcatgtcctgtccagagtttctggcggaccctccgtgttctgttctccaaagcctaaggacacctgatgatcagcagaa
25 cccctgaagtgacctgcgtggtggtagctttccaagaggacctgaggtgcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcaca
atgccaagaccaagcctagagaggaacagttcaacagcacctacagagtgggtgtccgtgctgaccgtgtgcaccaggattggctgaacg
gcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccaagag
aaccccaggtgtacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggttaagggcttctaccctc
cgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagacaacccctcctgtgctggacagcagcggctcattctt
30 cctgtacagcagactgacctggacaagagcagatggcaagagggaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaac
sactacaccagaagtctctgagcctgtctctgggcaag

SEQ ID NO: 85:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VH 16D6/человеческую
тяжелую цепь IgG4

atggagctgggctgagctggattttctgctggccatcctgaagggcgtgcagtgctcaggttcagctgcagcagctctggcggcagcttat
gaagcctggcgcctctgtgaagatcagctgcaagccaccggctacaccttcagcacctactgatcagtggggtcaagcagaggcctg
gccacggactggaatggatcggagagatcctgcctggcagcggcagcgccaactacaacgagaagttaaggcacaagccacctcac
cgccgacaccagcagcaacacagcctacatgcagctgagcagcctgaccttcaggacagcgcctgtactactgcgccaaaggcttcg
5 gcagcccctactactacgctatggattactggggccaggccaccagcgtgacagtgcttagcgcctctacaaggccctagcgtgtccc
tctggctcctgtagcagaagcaccagcagcttacagccgctctgggctgtctggtcaaggactactttccgagcctgtgaccgtgtcctg
gaattctggcgtctgacaagcggcgtgcacacctttcagctgtgctgcaaagcagcggcctgtactctctgagcagcgtggtcacagt
cctagctctagcctgggaccaagacctacacctgtaatgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagcgcgtggaatctaag
tacggccctcctgtcctccatgtcctgctccagagtttctcggcggaccctccgtgttctcttctccaaagcctaaggacaccctgatgat
10 cagcagaaccctgaagtacctgcgtggtggaggcgtttccaagaggaccctgaggtgcagttcaattggtacgtggacggcgtgga
agtgcacaacgccaaagaccaagcctagagaggaacagttcaactccacctacagatggtgtccgtgctgaccgtgctgaccaggattg
gctgaacggcacaagagtaacaagtcaaggtgtccaacaaggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggcca
gccaagagaaccccagggtgtacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaaccagggtgtcctgacctgcctcgtgaagggt
tctaccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaaactacaagacaacccctcctgtgctggacagcgacg
15 gctcattctcctgtacagcagactgaccgtggacaagagcagatggcaagagggaacgtgttctcctgacgctgatgcacgaggccct
gcacaaccactacaccagaagtctctgagcctgtctctgggcaag

SEQ ID NO: 86:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VH 20B4/человеческую
тяжелую цепь IgG4

atggagctgggctgagctggattttctgctggccatcctgaagggcgtgcagtgctcaggttcagctgcagcagctctggcggcagcttat
20 tggccccaagccagctctctgagcatcacctgtaccgtgtccggcttcagcctgacaagctatggcgtgactgggtccgacagcctccagg
caaggactggaatggctgggcatcatttgggctggcggcagcaccagctacaacagcgcctctgatgagccggctgagcatctcaagg
acaacagcaagagccagggttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatgtactactgcgccagagatcactacgac
ctgttcgcctattggggccagggcacactggftacagtgccgccctctacaaggccctagtgtttcctctggctccctgcagcaga
25 agcaccagcgaatctacagccgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagccagtgaccgtgtcctggaactctggcgtctgac
aagcggcgtgcacacattccagccgtgctgcaaagcagcggcctgtactctctgtccagcgtggtcacagtgcctagctctagcctgggc
accaagacctacacctgtaatgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagcgcgtggaatctaagtacggccctcctgtcctc
catgtcctgcacctgagtttctcggcggaccctccgtgttctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcagaaccctgaag
tgacctgcgtggtggtggacgtttccaagaggaccctgaggtgcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaga
30 ccaagcctagagaggaacagttcaacagcactacagatggtgtccgtgctgacagtgctgaccaggattggctgaacggcacaagagt
acaagtgcagggtgtccaacaaggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccagccaagagaaccccagg
tgtacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcagggtgtcctgacctgcctcgtgaagggttctaccctccgatatgcc
gtggaatgggagagcaatggccagcctgagaaactacaagacaacccctcctgtgctggacagcgacggctcatttctcctgtacagc
agactgaccgtggacaagagcagatggcaagagggaacgtgttcagctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacca
35 gaaaagcctgagcctgtctctgggcaag

SEQ ID NO: 87:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VH 30C7/человеческую тяжелую цепь IgG4

atggagctgggcctgagctggattttctgctggccatcctgaagggcgtgcagtgctcaggttcagctgcagcagctctggccccgaactgt
5 cagacctggcgtgtccgtgaagatcagctgtaaaggcagcggctacaccttcaccgactacgtgatgactgggtcaagcagagccacgc
caagagcctggaatggatcggcgtgatcagcactacagcggcaacaccaactacaaccagaagtcaagggcaaagccacatgacc
gtggacaagagcagcagcaccgcctacatggaactggccaggctgacctctgaggacagcgccatctactactgcgccagagagagcgc
acggctactacttcgattattggggccaggccaccactgacctgtctagcgcctctacaagggccctagcgtgttcctctggctcctt
gtagcagaagcaccagcagctctacagccgctctgggctgtctggtcaaggactactttcccgagcctgtgacagtgtcctggaactctgg
10 cgctctgacaagcggcgtgcacacattccaagccgtgctgcaaagcagcggcctgtactctctgagcagcgtggtcacagtgcctagctct
agcctgggcaccaagacctacacctgtaatgtggaccacaagcctccaacaccaagggtggacaagcgcgtggaatctaagtacggccct
cctgtctcctcatgtctgcacctgagtttctggcgaccctccgtgttctgttctccaagcctaaggacacctgatgatcagcagaa
cccctgaagtgacctgctgggtggagctttccaagaggacctgaggtgcaattcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcaca
acgccaagaccaagcctagagaggaacagtcaactccacctacagagtgggtgtccgtgctgacagtgtgcaccaggattggctgaacg
15 gcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaagggcctgctagcagcatcgagaaaaaccatcagcaaggccaagggccagccaagag
aaccacaggtgtacacactgcctccaagccaagaggaatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctctggaagggtcttacccctc
cgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagacaaccctcctgtgctggacagcgacggctcattct
cctgtacagcagactgacagtgataagagccggtggcaagagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgagggcctgcacaacca
ctacaccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag

20 SEQ ID NO: 88:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VL 8F3/человеческую легкую каппа-цепь

atggacatgagagttcccgtcagctgctgggactgctgctgctttggtttctggcgctagatgcgacgtgcagatcacacagagccctag
ctacctggctgcctctcctggcgagacaatcacatcaactgccgggccagcaagaccatcagcaagctacctggcctggtatcaagagaa
25 gcccggcaagaccaatgctgctgatctacagcggcagcactcagagcggagtgccctagcagatttccggctctggcagcggca
ccgatttcacctgaccataagcagcctggaacctgaggacctggccatgtactactgccagcagcacgacaggtaccttggacatttgg
cggaggcaccaagctggaataagcggacagtgccgctcctagcgtgtcattttccacctagcagcagcagctgaagtctggcac
agcctctgtcgtgtcctgtgtaacaacttctacccaagagaagccaaggtgcaagggtggacaacgcctcagctccggcaatag
ccaagagagcgtgaccgagcaggacagcaaggactctacctacgcctgagcagcaccctgacctgagcaaggccgactacgagaa
30 gcacaaagtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggccttctagccctgtgaccaagagcttcaaccggggcgaatgt

SEQ ID NO: 89:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VL 10E7/человеческую легкую каппа-цепь

atggacatgagagttcccgtcagctgctgggactgctgctgctttggtttctggcgctagatgcgacatccagatgaccagagcaccag
35 cagcctgtctgcctctctggcgatagcgtgacctcagctgtagagccagcaggacatcatcaactacctgaactggatcagcagaaa

cccgacggcaccgtgaagctgctgatctactacaccagcagactgcacagcggcgtgccagcagatcttgctctggaagcggcacc
gagtacagcctgaccgtgtccaacctggaaaaagaggatcgcctactcttccagcaaggcaagaccctgcctfacaccttggcg
gaggaccaagctggaaatcaagcggacagtggccgctcctagcgtgttcatcttccacctagcagcagcagctgaagtctggcacag
cctctgtcgtgtcctgtgaacaacttctaccccagagaagccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgcctgcagagcggcaatagcc
5 aagagagcgtgaccgagcaggacagcaaggactctacctatagcctgagcagcaccctgacactgagcaaggccgactacgagaagca
caagtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggccttctagccctgtgaccaagagcttcaaccggggcgaatgt

SEQ ID NO: 90:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VL 16D6/человеческую легкую каппа-цепь

10 atggacatgagagtcccgctcagctgctgggactgctgctgcttggttcctggcgctagatgagatcgtgctgacacagagccctgct
ctgatggctgctcccctggcgagaaagtgaccatcacctgtagcgtgtccagcagcatcagcagctccaacctgcaactggtatcagcaga
agtccgagacaagcccaagccttgatctacggcacaagcaaaactggccagcggcgtgccagtcaatcttgctctggcagcggca
ccagctacagcctgaccatcagcaacatggaagccgaggatgccgccactactactgccagcagtggtccagcttccactgaccttgg
cggaggaccaagctggaaatcaagcggacagtggccgctcctagcgtgttcatcttccacctagcagcagcagctgaagtctggcac
15 agcctctgtcgtgtcctgtgaacaacttctaccccagagaagccaaggtgcaatggaaggtggacaacgcctgcagagcggcaatag
ccaagagagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctatagcctgagcagcaccctgacactgagcaaggccgactacgagaa
gcacaaagtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggccttctagccctgtgaccaagagcttcaaccggggcgaatgt

SEQ ID NO: 91:

Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VL 20B4/человеческую легкую каппа-цепь

20 atggacatgagagtcccgctcagctgctgggactgctgctgcttggttcctggcgctagatgagacatcctgatgacacagagccccag
ctcatgtccgtgtcttggcgataaccgtgtccatcacatgtcacgccagccaggacatcagccggaatatcggtatggctgacagagaag
cccggaagagctttaaggcctgatctaccacggcaccaacctggaagatggcgtgccagcagatcttccggctctggatctggcgcc
gactacagcctgacaatcagcagcctggaaagcaggacttcgccgattactactgctgagcagctacgccagtttctcggacatttggcg
25 gaggcacaagctggaaatcaagcggacagtggccgctcctagcgtgttcatcttccacctagcagcagcagctgaagtctggcacag
cctctgtcgtgtcctgtgaacaacttctaccccagagaagccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgcctgcagagcggcaatagcc
aagagagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctatagcctgagcagcaccctgacactgagcaaggccgactacgagaagc
acaaagtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggccttctagccctgtgaccaagagcttcaaccggggcgaatgt

SEQ ID NO: 92:

30 Последовательность кДНК, кодирующая химерную мышиную VL 30C7/человеческую легкую каппа-цепь

atggacatgagagtcccgctcagctgctgggactgctgctgcttggttcctggcgctagatgagacatcctgatgtctcagagccctagc
agcctggctgtgtctgccggcgagaaagtgaccatgagctgcaagagcagccagagcctgctgaacagccggaccagaaagaactacc
tggcctggtatcagcagaagcccgacagtctccaagctgctgatctactgggccagcaccagagaagcggcgtgccgatagattca
35 caggcagcggcagcggaaaccgacttaccctgacaatcagctctgtgcaggccgaggatctggccgtgtactactgcaagcagagctac

aacctgatgtacaccttcggcggaggcaccaagctggaaatcaagagaacagtgccgctcctagcgtgttcattctccacctccgacg
agcagctgaagtctggcacagcctctgtcgtgtgcctgctcaacaacttctaccccagagaagccaaggtgcagtggaaggtggacaacg
ccctgcagagcggcaatagccaagagagcgtgaccgagcaggacagcaaggactctacctacagcctgagcagcacactgacctgag
caaggccgactacgagaagcacaaaagtgtacgcctgcgaagtgaccaccaggcccttctagccctgtgaccaagagcttcaaccggg
5 gcgaatgt

SEQ ID NO: 93:

Аминокислотная последовательность химерной мышинной VH 8F3/человеческой тяжелой цепи IgG4

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQ
10 TPKRLEWVATMHSGGTYTYYPDNVKGRFTISRDNANKNNLYLQMSSLRSEDAMYYC
ARETGLYDGLDFDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
15 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 94:

Аминокислотная последовательность химерной мышинной VH 10E7/человеческой тяжелой цепи IgG4

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGLTFSSYGMSWVRQT
20 PDKRLELVATINGNGDITYYPSVKGGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLKSEDAMYYCARD
YDYDYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
25 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 95:

Аминокислотная последовательность химерной мышинной VH 16D6/человеческой тяжелой цепи IgG4

MELGLSWIFLLAILKGVQCQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWVKQ
30 RPHGLEWIGEILPGSGSANYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTFEDSAVYYCAK
GFGSPYYYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
35 KRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGLK
SEQ ID NO: 96:

5 Аминокислотная последовательность химерной мышиной VH 20B4/человеческой тяжелой цепи IgG4

MELGLSWIFLLAILKGVQCRVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVVRQP
GKGLEWLGIIWAGGSTSYNSALMSRLSISKDNSKSVFLKMNSLQTDAMYYCARDH
YDLFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
10 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGLK

15 SEQ ID NO: 97:

Аминокислотная последовательность химерной мышиной VH 30C7/человеческой тяжелой цепи IgG4

MELGLSWIFLLAILKGVQCQVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYVMHWVKQ
SHAKSLEWIGVISTYSGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAR
20 ESDGYFFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK
SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
25 LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGLK

SEQ ID NO: 98:

Аминокислотная последовательность химерной мышиной VL 8F3/человеческой легкой каппа-цепи

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKTISKYLAWYQ
30 EKPGKTNMLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISSLEPEDLAMYYCQQHDEYPWT
FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 99:

35 Аминокислотная последовательность химерной мышиной VL 10E7/человеческой легкой каппа-цепи

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSTSSLSASLGDSVTISCRASQDIINYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTEYSLTVSNLEKEDIATYFCQQGKTLPYT
FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 SEQ ID NO: 100:

Аминокислотная последовательность химерной мышиной VL 16D6/человеческой легкой
каппа-цепи

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCEIVLTQSPALMAASPGKEKVTITCSVSSSISSSNLHWY
QQKSETSPKPWIYGTSKLAGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISNMEAEDAATYYCQQWSSFPL
10 TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 101:

Аминокислотная последовательность химерной мышиной VL 20B4/человеческой легкой
каппа-цепи

15 MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSIITCHASQDISRNIGWLQ
QKPGKSFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPRT
FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 102:

20 Аминокислотная последовательность химерной мышиной VL 30C7/человеческой легкой
каппа-цепи

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRK
NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCK
QSYNLMYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
25 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO: 103: Праймер для ПЦР

ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGSGTTG

SEQ ID NO: 104: Праймер для ПЦР

30 ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG

SEQ ID NO: 105: Праймер для ПЦР

ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTCAGCTTC

SEQ ID NO: 106: Праймер для ПЦР

ATGGGCWTCA AAGATGGAGT CACA

35 SEQ ID NO: 107: Праймер для ПЦР

ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

SEQ ID NO: 108: Праймер для ПЦР

ACTGGATGGT GGAAGATGG

SEQ ID NO: 109: Праймер для ПЦР

5 ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

SEQ ID NO: 110: Праймер для ПЦР

ATGRACTTTG GGYTCAGCTT GRTTT

SEQ ID NO: 111: Праймер для ПЦР

ATGGCTTGTC YTTRGSGCTR CTCTTCTGC

10 SEQ ID NO: 112: Праймер для ПЦР

ATGGRATGGA GCKGGGTCTT TMTCTT

SEQ ID NO: 113: Праймер для ПЦР

ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCT

SEQ ID NO: 114: Праймер для ПЦР

15 CAGTGGATAG ACAGATGGGG G

SEQ ID NO: 115: Праймер для ПЦР

AAGATGGATA CAGTTGGTGC

SEQ ID NO: 116: Праймер для ПЦР

GASRTHSTGA TGACCCAGAC NCC

20 SEQ ID NO: 117:

Аминокислотная последовательность варибельной области VH1 тяжелой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVST
INGNGDITYY

25 61 PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY DYDYAMDYWG
QGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 118:

Аминокислотная последовательность варибельной области VH2 тяжелой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

30 1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT
INGNGDITYY

61 PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY DYDYAMDYWG
QGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 119:

Аминокислотная последовательность вариабельной области VH3 тяжелой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAT
INGNGDITYY

5 61 PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY DYDYAMDYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 120:

Аминокислотная последовательность вариабельной области VL1 легкой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

10 1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS

61 RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ GKTLPTYTFGQ GTKLEIK

SEQ ID NO: 121:

15 Аминокислотная последовательность вариабельной области VL2 легкой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS

61 RFSGSGSGTD YTLTISLQP EDFATYYCQQ GKTLPTYTFGQ GTKLEIK

SEQ ID NO: 122:

20 Аминокислотная последовательность вариабельной области VL3 легкой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKAVKLLIYY
TSRLHSGVPS

61 RFSGSGSGTD YTLTISLQP EDFATYYCQQ GKTLPTYTFGQ GTKLEIK

25 SEQ ID NO: 123:

Аминокислотная последовательность вариабельной области VL4 легкой цепи гуманизированного антитела к CD89 человека 10E7

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKTVKLLIYY
TSRLHSGVPS

30 61 RFSGSGSGTD YTLTISLQP EDFATYFCQQ GKTLPTYTFGQ GTKLEIK

SEQ ID NO: 124:

Последовательность кДНК, кодирующая гуманизированную цепь IgG4 антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизированную VH1

1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct ccagcgccta
35 ctctgaggtg

61 cagctgctgg aatctggcgg aggattggtt cagcctggcg gctctctgag
 actgtcttgt
 121 gctgcttctg gcctgacctt ctctctctac ggcatgtcct gggtcggaca
 ggctcctgga
 5 181 aaaggcctgg aatgggtgtc caccatcaac ggcaacggcg acatcaccta
 ctatccccgac
 241 tccgtgaagg gcagattcac catctctcgg gacaactcca agaacaccct
 gtacctgcag
 301 atgaactccc tgagagccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagaga
 10 ctacgactac
 361 gattacgcca tggactactg gggccagggc aacttggtta ccgtgtcctc
 tgcttccacc
 421 aagggaccct ctgtgttccc tctggctcct tgctccagat ccacctccga
 gtctacagct
 15 481 gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttt cctgagcctg tgaccgtgtc
 ttggaactct
 541 ggcgctctga catccggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcaatccag
 cggcctgtac
 601 tctctgtcct ccgtcgtgac cgtgccttct agctctctgg gcaccaagac
 20 ctacacctgt
 661 aatgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gcgtggaatc
 taagtacggc
 721 cctccttgtc ctccatgtcc tgctccagag tttctcggcg gaccttccgt
 gtttctgttc
 25 781 cctccaaagc ctaaggacac cctgatgatc tctcggacct ctgaagtgac
 ctgcgtggtg
 841 gtggatgtgt cccaagagga cccagagggtg cagttcaatt ggtacgtgga
 cggcgtggaa
 901 gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagttca actccaccta
 30 cagagtgggtg
 961 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggaa aagagtacaa
 gtgcaagggtg
 1021 tccaacaagg gcctgccttc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa
 gggccagcct
 35 1081 agggaaacccc aggtttacac cctgcctcca agccaagagg aatgaccaa
 gaaccaggtg

1141 tccctgacct gcctcgtgaa gggattctac ccctccgata tcgccgtgga
 atgggagtct
 1201 aatggccagc ctgagaacaa ctacaagaca acccctcctg tgctggactc
 cgacggcagc
 5 1261 ttcttcctgt attcccgcct gaccgtggac aagtccagat ggcaagaggg
 caacgtgttc
 1321 tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca cccagaagtc
 cctgtctctg
 1381 tccctgggca ag

10 SEQ ID NO: 125:

Последовательность κДНК, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 антитела к CD89
 человека 10E7, включающая гуманизованную VH2

1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct ccagcgccta
 ctctgaggtg
 15 61 cagctgctgg aatctggcgg aggattggtt cagcctggcg gctctctgag
 actgtcttgt
 121 gctgcttctg gcctgacctt ctctcctac ggcatgtcct gggtcgaca
 ggctcctgga
 181 aaaggcctgg aatgggtcgc caccatcaac ggcaacggcg acatcaccta
 20 ctatcccagc
 241 tccgtgaagg gcagattcac catctctcgg gacaactcca agaacaccct
 gtacctgcag
 301 atgaactccc tgagagccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagaga
 ctacgactac
 25 361 gattacgcca tggactactg gggccagggc aactgggta cctgtcctc
 tgcttccacc
 421 aagggacct ctgtgttccc tctggctcct tgctccagat ccacctccga
 gtctacagct
 481 gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttt cctgagcctg tgaccgtgtc
 30 ttggaactct
 541 ggcgctctga catccggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcaatccag
 cggcctgtac
 601 tctctgtcct ccgtcgtgac cgtgccttct agctctctgg gcaccaagac
 ctacacctgt
 35 661 aatgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gcgtggaatc
 taagtacggc

721 cctccttgtc ctccatgtcc tgctccagag tttctcggcg gaccttccgt
 gtttctgttc
 781 cctccaaagc ctaaggacac cctgatgatc tctcggaccc ctgaagtgac
 ctgcgtggtg
 5 841 gtggatgtgt cccaagagga cccagaggtg cagttcaatt ggtacgtgga
 cggcgtggaa
 901 gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagttca actccaccta
 cagagtgggtg
 961 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggaa aagagtacaa
 10 gtgcaagggtg
 1021 tccaacaagg gcctgccttc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa
 gggccagcct
 1081 agggaaacccc aggtttacac cctgcctcca agccaagagg aatgaccaa
 gaaccagggtg
 15 1141 tccttgacct gcctcgtgaa gggattctac ccctccgata tcgccgtgga
 atgggagtct
 1201 aatggccagc ctgagaacaa ctacaagaca acccctcctg tgctggactc
 cgacggcagc
 1261 ttcttctgt attcccgcct gaccgtggac aagtccagat ggcaagaggg
 20 caacgtgttc
 1321 tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca cccagaagtc
 cctgtctctg
 1381 tccctgggca ag

SEQ ID NO: 126:

25 Последовательность кДНК, кодирующая гуманизированную цепь IgG4 антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизированную VH3

1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgtttct ccagcgccta
 ctctgaggtg
 61 cagctgctgg aatctggcgg aggattgggt cagcctggcg gctctctgag
 30 actgtcttgt
 121 gctgcttctg gcctgacctt ctctcctac ggcatgtcct gggtcggaca
 ggctcctgga
 181 aaaggcctgg aactgggtggc taccatcaac ggcaacggcg acatcaccta
 ctatcccagc
 35 241 tccgtgaagg gcagattcac catctctcgg gacaactcca agaacaccct
 gtacctgcag

301 atgaactccc tgagagccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagaga
 ctacgactac
 361 gattacgcca tggactactg gggccagggc aacttggtta ccgtgtcctc
 tgcttccacc
5 421 aagggaccct ctgtgttccc tctggctcct tgctccagat ccacctccga
 gtctacagct
 481 gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttt cctgagcctg tgaccgtgtc
 ttggaactct
 541 ggcgctctga catccggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcaatccag
10 cggcctgtac
 601 tctctgtcct ccgtcgtgac cgtgccttct agctctctgg gcaccaagac
 ctacacctgt
 661 aatgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gcgtggaatc
 taagtacggc
15 721 cctccttgtc ctccatgtcc tgctccagag tttctcggcg gaccttccgt
 gtttctgttc
 781 cctccaaagc ctaaggacac cctgatgatc tctcggacc ctgaagtgac
 ctgcgtggtg
 841 gtggatgtgt cccaagagga ccagaggtg cagttcaatt ggtacgtgga
20 cggcgtggaa
 901 gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagttca actccaccta
 cagagtgggtg
 961 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggaa aagagtacaa
 gtgcaaggtg
25 1021 tccaacaagg gcctgccttc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa
 gggccagcct
 1081 agggaaacccc aggtttacac cctgcctcca agccaagagg aatgaccaa
 gaaccaggtg
 1141 tccctgacct gcctcgtgaa gggattctac ccctccgata tcgccgtgga
30 atgggagtct
 1201 aatggccagc ctgagaacaa ctacaagaca acccctcctg tgctggactc
 cgacggcagc
 1261 ttcttctctgt attcccgcct gaccgtggac aagtccagat ggcaagaggg
 caacgtgttc
35 1321 tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca ccagaagtc
 cctgtctctg

1381 tccctgggca ag

SEQ ID NO: 127:

Последовательность кДНК, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL1

5 1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct cctccgccta
ctccgacatc
61 cagatgaccc agtctccatc ctctctgtcc gcctctgtgg gcgacagagt
gaccatcacc
121 tgtagagcca gccaggacat catcaactac ctgaactggg atcagcagaa
10 gcccggaag
181 gccctaagc tgctgatcta ctacacctct cggctgcact ctggcgtgcc
ctctagattt
241 tctggctccg gctctggcac cgactttacc ctgacaatct ccagcctgca
gcctgaggac
15 301 ttcgccacct actattgcca gcagggcaag accctgcctt acacctttgg
ccagggcacc
361 aagctggaaa tcaagcggac agtggccgct ccttccgtgt tcatcttccc
accttccgac
421 gagcagctga agtccggcac agcttctgtc gtgtgcctgc tgaacaactt
20 ctaccctcgg
481 gaagccaagg tgcaagtggaa ggtggacaat gccctgcagt ccggcaactc
ccaagagtct
541 gtgaccgagc aggactccaa ggacagcacc tacagcctgt cctccacact
gaccctgtcc
25 601 aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgaag tgaccatca
gggcctgtct
661 agccctgtga ccaagtcttt caaccggggc gagtgt

SEQ ID NO: 128:

Последовательность кДНК, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL2

30 1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct cctccgccta
ctccgacatc
61 cagatgaccc agtctccatc ctctctgtcc gcctctgtgg gcgacagagt
gaccatcacc

121 tgtagagcca gccaggacat catcaactac ctgaactggg atcagcagaa
 gcccggaag
 181 gccctaagc tgctgatcta ctacacctct cggctgcaact ctggcgtgcc
 ctctagattt
5 241 tctggctccg gctctggcac cgactatacc ctgacaatct ccagcctgca
 gcctgaggac
 301 ttcgccacct actattgcca gcagggcaag accctgcctt acacctttgg
 ccagggcacc
 361 aagctggaaa tcaagcggac agtggccgct ccttccgtgt tcattttccc
10 accttccgac
 421 gagcagctga agtccggcac agcttctgtc gtgtgcctgc tgaacaactt
 ctaccctcgg
 481 gaagccaagg tgcagtggaa ggtggacaat gccctgcagt ccggcaactc
 ccaagagtct
15 541 gtgaccgagc aggactccaa ggacagcacc tacagcctgt cctccacact
 gaccctgtcc
 601 aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgaag tgaccatca
 gggcctgtct
 661 agccctgtga ccaagtcttt caaccggggc gagtgt
20 **SEQ ID NO: 129:**
Последовательность кДНК, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL3
 1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct cctccgccta
 ctccgacatc
25 61 cagatgacc agtctccatc ctctctgtcc gcctctgtgg gcgacagagt
 gaccatcacc
 121 tgtagagcca gccaggacat catcaactac ctgaactggg atcagcagaa
 acccggaag
 181 gccgtgaagc tgctgatcta ctacacctct cggctgcaact ctggcgtgcc
30 ctctagattt
 241 tctggctccg gctctggcac cgactatacc ctgacaatct ccagcctgca
 gcctgaggac
 301 ttcgccacct actattgcca gcagggcaag accctgcctt acacctttgg
 ccagggcacc
35 361 aagctggaaa tcaagcggac agtggccgct ccttccgtgt tcattttccc
 accttccgac

421 gagcagctga agtccggcac agcttctgtc gtgtgcctgc tgaacaactt
ctaccctcgg
481 gaagccaagg tgcagtggaa ggtggacaat gccctgcagt ccggcaactc
ccaagagtct
5 541 gtgaccgagc aggactccaa ggacagcacc tacagcctgt cctccacact
gaccctgtcc
601 aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgaag tgaccatca
ggcctgtct
661 agccctgtga ccaagtcttt caaccggggc gagtgt

10 SEQ ID NO: 130:

Последовательность кДНК, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL4

1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct cctccgccta
ctccgacatc
15 61 cagatgaccc agtctccatc ctctctgtcc gcctctgtgg gcgacagagt
gaccatcacc
121 tgtagagcca gccaggacat catcaactac ctgaactggg atcagcagaa
accggcaag
181 accgtgaagc tgctgatcta ctacacctct cggctgcact ctggcgtgcc
20 ctctagattt
241 tctggctccg gctctggcac cgactatacc ctgacaatct ccagcctgca
gcctgaggac
301 ttcgctacct acttctgcca gcaaggcaag accctgcctt acacctttgg
ccagggcacc
25 361 aagctggaaa tcaagcggac agtggccgct ccttccgtgt tcatcttccc
accttccgac
421 gagcagctga agtccggcac agcttctgtc gtgtgcctgc tgaacaactt
ctaccctcgg
481 gaagccaagg tgcagtggaa ggtggacaat gccctgcagt ccggcaactc
30 ccaagagtct
541 gtgaccgagc aggactccaa ggacagcacc tacagcctgt cctccacact
gaccctgtcc
601 aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgaag tgaccatca
ggcctgtct
35 661 agccctgtga ccaagtcttt caaccggggc gagtgt

SEQ ID NO: 131:

Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH1

1 MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLLESGGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY
GMSWVRQAPG

5 61 KGLEWVSTIN GNGDITYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA
VYYCARDYDY

121 DYAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS

10 181 GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK
VDKRVESKYG

241 PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV
QFNWYVDGVE

301 VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
KTISKAKGQP

15 361 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS

421 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

SEQ ID NO: 132:

Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH2

1 MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLLESGGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY
GMSWVRQAPG

61 KGLEWVATIN GNGDITYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA
VYYCARDYDY

25 121 DYAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS

181 GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK
VDKRVESKYG

30 241 PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV
QFNWYVDGVE

301 VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
KTISKAKGQP

361 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS

35 421 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

SEQ ID NO: 133:

Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH3

1 MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLLES GGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY
5 GMSWVRQAPG
61 KGLELVATIN GNGDITYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA
VYYCARDYDY
121 DYAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS
10 181 GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK
VDKRVESKYG
241 PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV
QFNWYVDGVE
301 VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
15 KTISKAKGQP
361 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS
421 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

SEQ ID NO: 134:

20 Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL1

1 MKWVTFISLL FLFSSAYS DI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQDIINY
LNWYQQKPGK
61 APKLLIYYTS RLHSGVPSRF SGSGSGTDFT LTISSLQPED FATYYCQQGK
25 TLPYTFGQGT
121 KLEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN
ALQSGNSQES
181 VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNNG EC

SEQ ID NO: 135:

30 Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL2

1 MKWVTFISLL FLFSSAYS DI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQDIINY
LNWYQQKPGK
61 APKLLIYYTS RLHSGVPSRF SGSGSGTDYT LTISSLQPED FATYYCQQGK
35 TLPYTFGQGT

121 KLEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN
ALQSGNSQES

181 VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 136:

- 5 Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL3

1 MKWVTFISLL FLFSSAYS DI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQDIINY
LNWYQQKPGK

61 AVKLLIYYTS RLHSGVPSRF SGSGSGTDYT LTISSLQPED FATYYCQQGK
10 TLPYTFGQGT

121 KLEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN
ALQSGNSQES

181 VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 137:

- 15 Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную каппа-цепь антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VL4

1 MKWVTFISLL FLFSSAYS DI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQDIINY
LNWYQQKPGK

61 TVKLLIYYTS RLHSGVPSRF SGSGSGTDYT LTISSLQPED FATYFCQQGK
20 TLPYTFGQGT

121 KLEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN
ALQSGNSQES

181 VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 138:

- 25 Аминокислотная последовательность вариабельной области VH3SQ тяжелой цепи гуманизованного антитела к CD89 человека 10E7 «с устраненным дезамидированием CDR2»

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAT
ISGQGDITYY

30 61 PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY DYDYAMDYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 139:

- 35 Аминокислотная последовательность вариабельной области VH3ST тяжелой цепи гуманизованного антитела к CD89 человека 10E7 «с устраненным дезамидированием CDR2»

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAT
ISGTGDITYY

61 PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY DYDYAMDYWG
QGTLVTVSS

5 SEQ ID NO: 140:

Последовательность кДНК, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 «с устраненным дезамидированием CDR2» антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH3SQ

1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct ccagcgccta
10 ctctgaggtg

61 cagctgctgg aatctggcgg aggattggtt cagcctggcg gctctctgag
actgtcttgt

121 gctgcttctg gcctgacctt ctctcctac ggcatgtcct gggtccgaca
ggctcctgga

15 181 aaaggcctgg aactggtggc taccatctct ggccagggcg acatcaccta
ctatcccgac

241 tctgtgaagg gcagattcac catcagccgg gacaactcca agaacaccct
gtacctgcag

301 atgaactccc tgagagccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagaga
20 ctacgactac

361 gattacgcca tggactactg gggccagggc aactgggta cctgtgcctc
tgcttccacc

421 aagggaccct ctgtgttccc tctggctcct tgctccagat ccacctccga
gtctacagct

25 481 gctctgggct gcctggtcaa ggactacttt cctgagcctg tgaccgtgtc
ttggaactct

541 ggcgctctga catccggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcaatccag
cggcctgtac

601 tctctgtcct ccgtcgtgac cgtgccttct agctctctgg gcaccaagac
30 ctacacctgt

661 aatgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gcgtggaatc
taagtacggc

721 cctccttgtc ctccatgtcc tgctccagag tttctcggcg gaccttccgt
gtttctgttc

35 781 cctccaaagc ctaaggacac cctgatgatc tctcggaccc ctgaagtgac
ctgcgtgggtg

841 gtggatgtgt cccaagagga cccagaggtg cagttcaatt ggtacgtgga
 cggcgtggaa
 901 gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagttca actccaccta
 cagagtgggtg
5 961 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggaa aagagtacaa
 gtgcaagggtg
 1021 tccaacaagg gcctgccttc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa
 gggccagcct
 1081 agggaacccc aggtttacac cctgcctcca agccaagagg aatgaccaa
10 gaaccagggtg
 1141 tccctgacct gcctcgtgaa gggcttctac ccttccgata tcgccgtgga
 atgggagagc
 1201 aatggccagc ctgagaacaa ctacaagaca acccctcctg tgctggactc
 cgacggcagc
15 1261 ttcttctgt attctcgct gaccgtggac aagtccagat ggcaagaggg
 caacgtgttc
 1321 tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca cccagaagtc
 cctgtctctg
 1381 tccctgggca ag

20 SEQ ID NO: 141:

Последовательность кДНК, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 «с устраненным дезамидированием CDR2» антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH3ST

1 atgaaatggg tcacctttat ctccctgctg ttctgttct ccagcgccta
25 ctctgagggtg
 61 cagctgctgg aatctggcgg aggattggtt cagcctggcg gctctctgag
 actgtcttgt
 121 gctgcttctg gcctgacctt ctctcctac ggcatgtcct gggctccgaca
 ggctcctgga
30 181 aaaggcctgg aactggtggc taccatctct ggcaccggcg acatcaccta
 ctatccccgac
 241 tctgtgaagg gcagattcac catcagccgg gacaactcca agaacaccct
 gtacctgcag
 301 atgaactccc tgagagccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagaga
35 ctacgactac

361 gattacgcc a tggactactg gggccagggc aacttggtta ccgtgtcctc
 tgcttccacc
 421 aagggaccct ctgtgttccc tctggctcct tgctccagat ccacctccga
 gtctacagct
5 481 gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttt cctgagcctg tgaccgtgtc
 ttggaactct
 541 ggcgctctga catccggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcaatccag
 cggcctgtac
 601 tctctgtcct ccgtcgtgac cgtgccttct agctctctgg gcaccaagac
10 ctacacctgt
 661 aatgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gcgtggaatc
 taagtacggc
 721 cctccttgtc ctccatgtcc tgctccagag tttctcggcg gaccttccgt
 gtttctgttc
15 781 cctccaaagc ctaaggacac cctgatgatc tctcggaccc ctgaagtgac
 ctgcgtggtg
 841 gtggatgtgt cccaagagga cccagagggtg cagttcaatt ggtacgtgga
 cggcgtggaa
 901 gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagttca actccaccta
20 cagagtgggtg
 961 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggaa aagagtacaa
 gtgcaagggtg
 1021 tccaacaagg gcctgccttc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa
 gggccagcct
25 1081 agggaaacccc aggtttacac cctgcctcca agccaagagg aatgaccaa
 gaaccaggtg
 1141 tccctgacct gcctcgtgaa gggcttctac ccttccgata tcgccgtgga
 atgggagagc
 1201 aatggccagc ctgagaacaa ctacaagaca acccctcctg tgctggactc
30 cgacggcagc
 1261 ttcttctgt attctcgct gaccgtggac aagtccagat ggcaagaggg
 caacgtgttc
 1321 tctgtctccg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca ccagaagtc
 cctgtctctg
35 1381 tccctgggca ag

SEQ ID NO: 142:

Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 «с устраненным дезамидированием CDR2» антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH3SQ

1 MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLLESGGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY
5 GMSWVRQAPG
61 KGLELVATIS **G**QGDITYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA
VYYCARDYDY
121 DYAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS
10 181 GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK
VDKRVESKYG
241 PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV
QFNWYVDGVE
301 VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
15 KTISKAKGQP
361 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS
421 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
SEQ ID NO: 143:

20 Аминокислотная последовательность, кодирующая гуманизованную цепь IgG4 «с устраненным дезамидированием CDR2» антитела к CD89 человека 10E7, включающая гуманизованную VH3ST

1 MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLLESGGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY
GMSWVRQAPG
25 61 KGLELVATIS **G**TGDITYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA
VYYCARDYDY
121 DYAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS
181 GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK
30 VDKRVESKYG
241 PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV
QFNWYVDGVE
301 VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
KTISKAKGQP

361 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS
421 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело к CD89 человека, которое может связывать внеклеточную часть CD89 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLX₁VX₂T
IX₃GX₄GDITYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY
DYDYAMDYWG QGTLVTVSS

где:

X₁ представляет собой L или W

X₂ представляет собой A или S

X₃ представляет собой N, S

X₄ представляет собой Q, T или N,

причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит 0, 1, 2 или 3 вариации, вставки, делеции, замены, добавления аминокислот по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от X₁, X₂, X₃ и X₄,

и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDII NYLNWYQQKP GKZ₁Z₂KLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD Z₃TLTISSLQP EDFATYZ₄CQQ GKTLPTYTFGQ GTKLEIK

где:

Z₁ представляет собой A или T

Z₂ представляет собой V или P

Z₃ представляет собой Y или F

Z₄ представляет собой Y или F,

причем указанная вариабельная область легкой цепи содержит 0, 1, 2 или 3 вариации, вставки, делеции, замены, добавления аминокислот по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от Z₁, Z₂, Z₃ и Z₄.

2. Гуманизированное антитело к CD89 человека по п. 1, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи имеет устраненное дезамидирование.

3. Гуманизированное антитело к CD89 человека по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAT
ISGX₄GDITYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDY
DYDYAMDYWG QGTLVTVSS, где X₄ представляет собой Q, T или N,

и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, содержащую 0, 1, 2 или 3 вариации, вставки, делеции, замены, добавления аминокислот по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что указанное антитело имеет изотип IgG1 или IgG4.

5. Гуманизованное антитело к CD89 человека по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142 или 143 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 136 с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 вставками, делециями, заменами или добавлениями аминокислот.

6. Антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что указанное антитело обладает более высокой аффинностью в отношении указанной внеклеточной части CD89 человека по сравнению с химерным антителом, содержащим тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94, и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99.

7. Антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что указанное антитело может связывать внеклеточную часть CD89 человека на клетках, экспрессирующих CD89 человека, и может предотвращать связывание IgA человека с CD89 человека, когда указанное антитело связано с указанными клетками.

8. Антитело по п. 7, отличающееся тем, что указанные клетки представляют собой клетки HEK293F, экспрессирующие CD89 человека (депонированные под номером DSM ACC3341).

9. Молекула нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело по любому из пп. 1-8 или его антиген (CD89 человека)-связывающий фрагмент.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область антитела по любому из пп. 1-8.

11. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по пп. 9 или 10.

12. Клетка, содержащая антитело по пп. 1-8, молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9 и 10 и/или вектор по п. 11, отличающаяся тем, что указанная

клетка представляет собой клетку млекопитающего, насекомого, растения, бактериальную или дрожжевую клетку, более предпочтительно клетку человека.

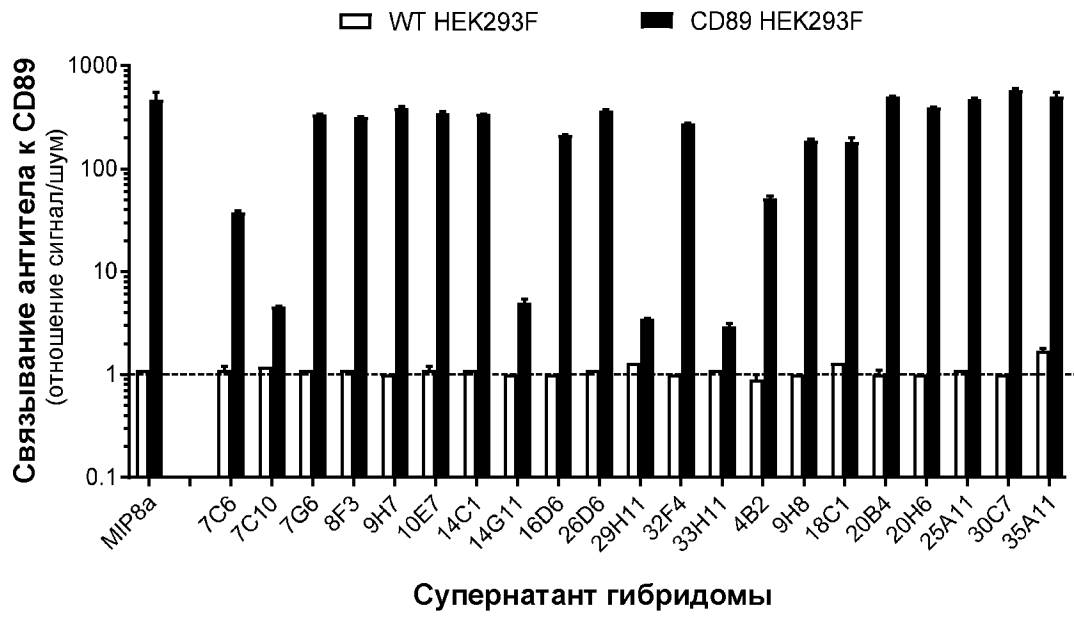
13. Способ получения антитела по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанный способ включает сбор указанного антитела, и указанные антитела предпочтительно получают с использованием клетки и сбора клетки, причем указанная клетка предпочтительно представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6™.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-8 или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9 и 10 и/или вектор по п. 11.

15. Антитело по пп. 1-8 или его антигенсвязывающий фрагмент, молекула или молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9 и 10 и/или вектор по п. 11 для применения в лечении или профилактике хронических воспалительных заболеваний.

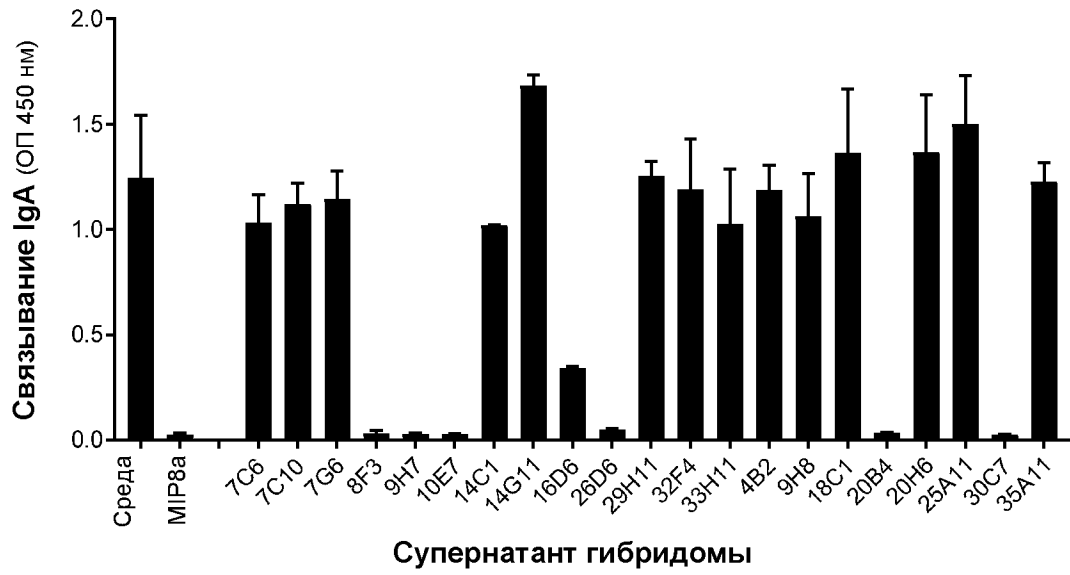
16. Способ лечения хронических воспалительных заболеваний у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по пп. 1-8 или его антигенсвязывающего фрагмента, молекулы или молекул нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9 и 10 и/или вектора по п. 11.

Фигура 1

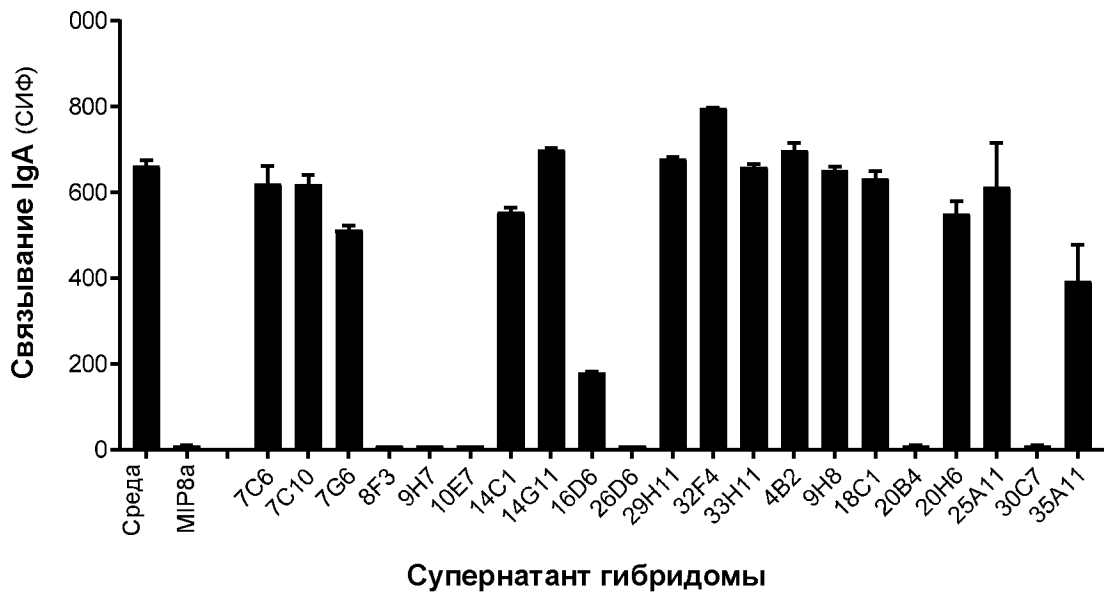


Фигура 2

А

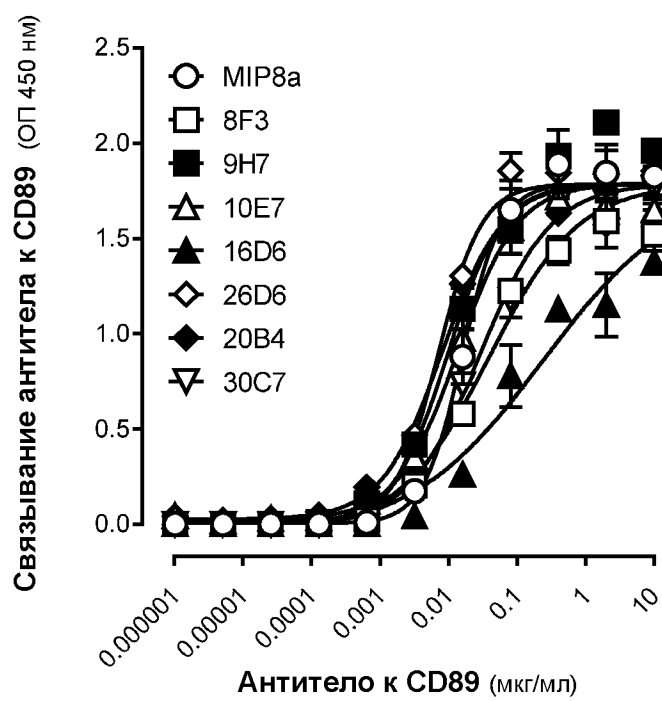


В

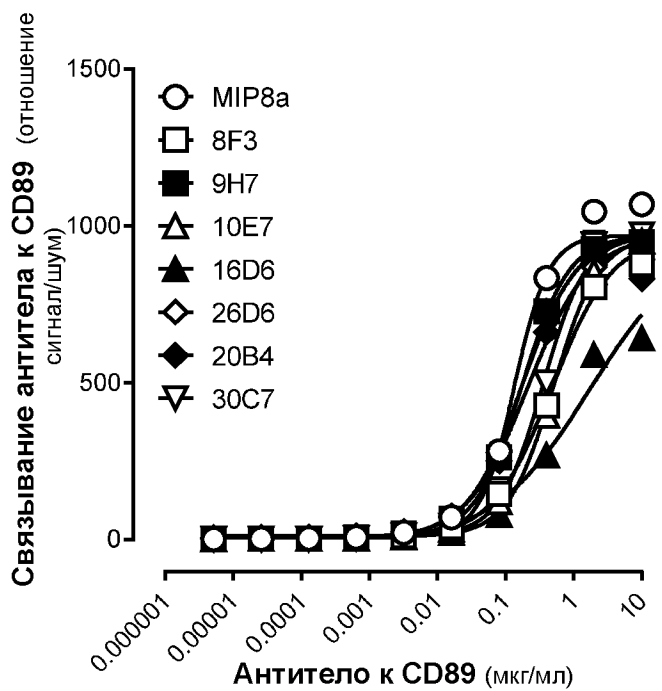


Фигура 3

А

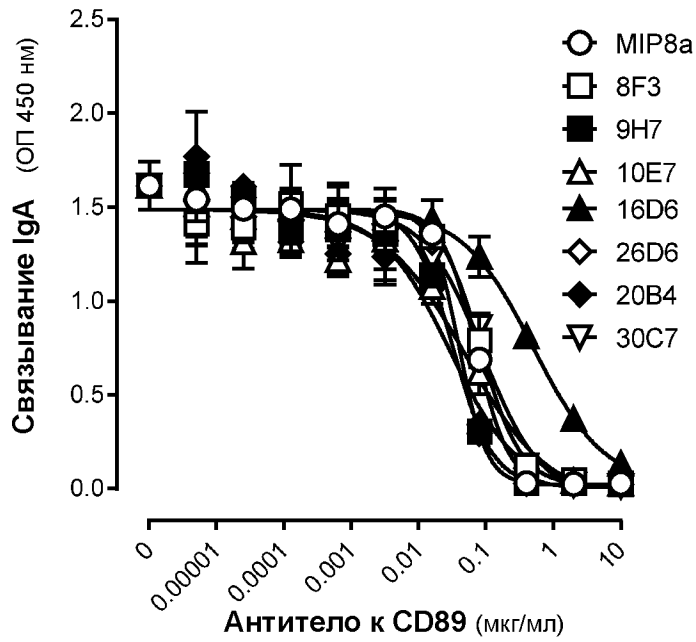


В

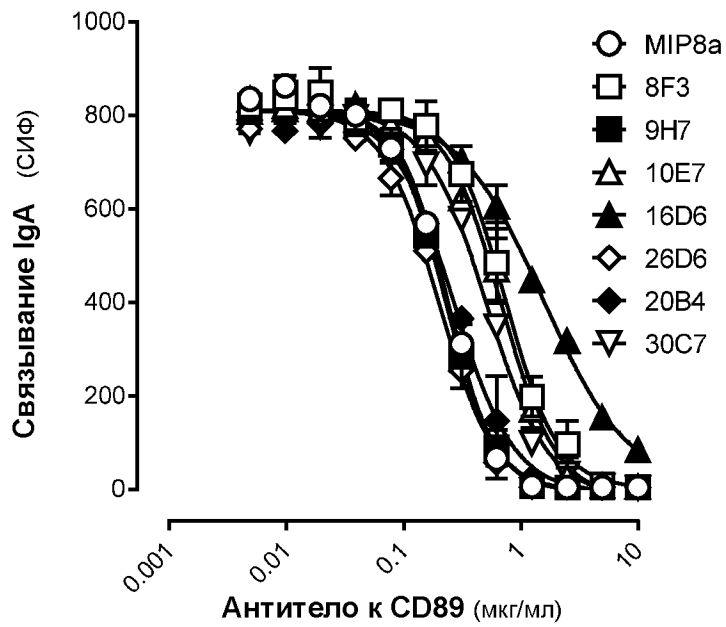


Фигура 4

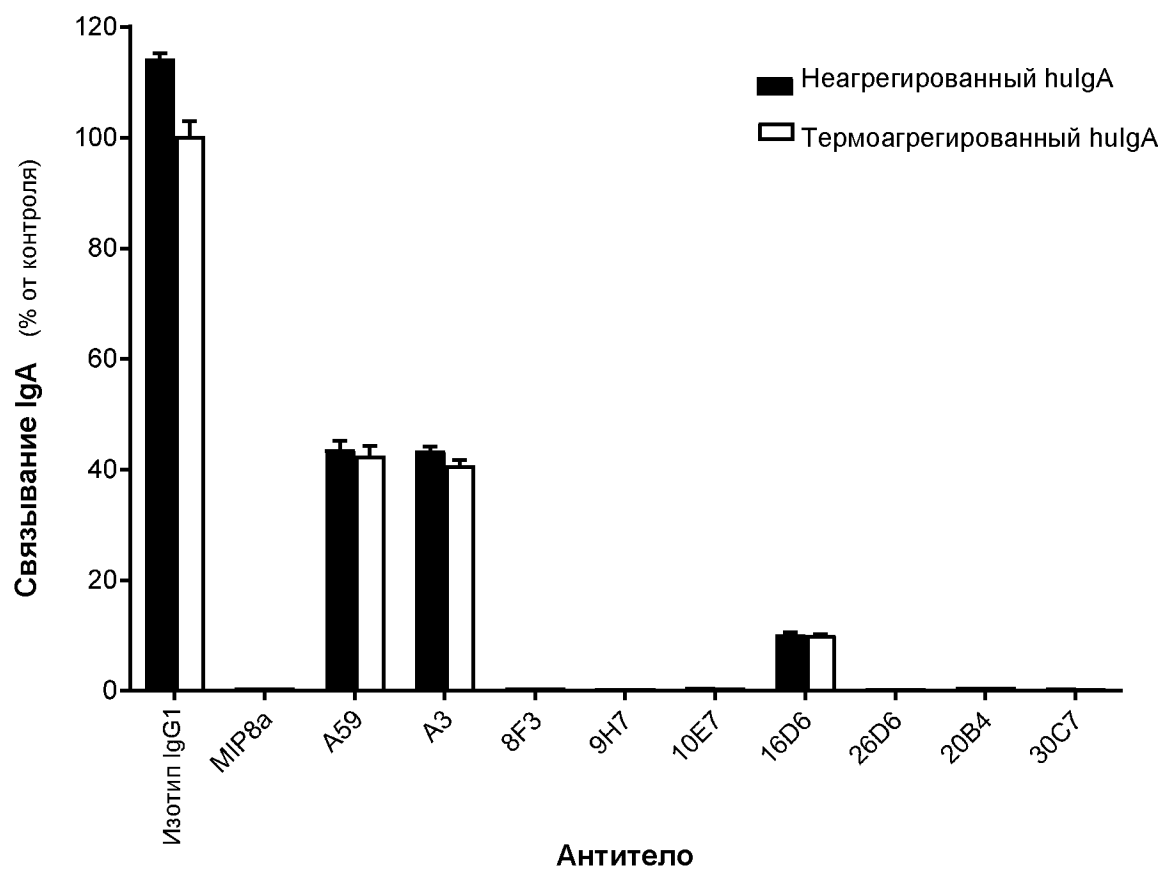
А



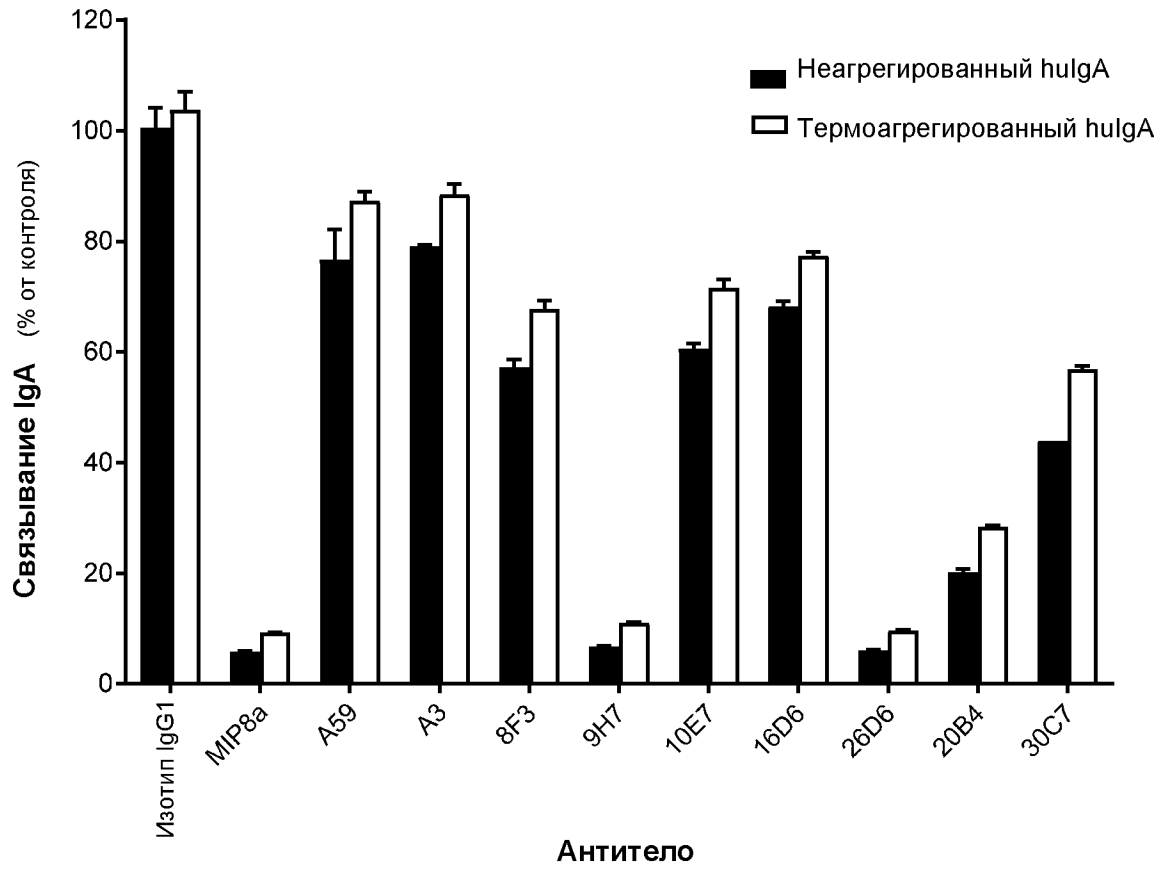
В



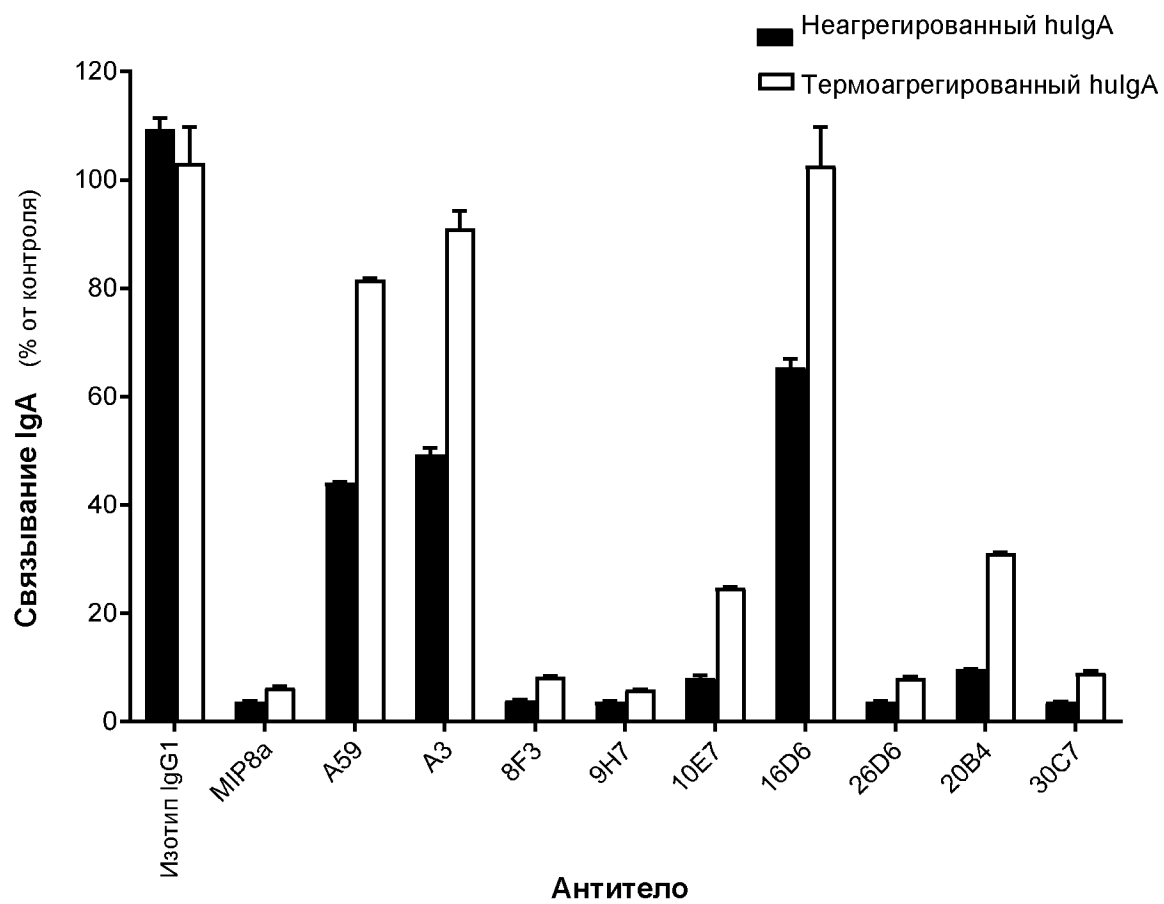
Фигура 5А



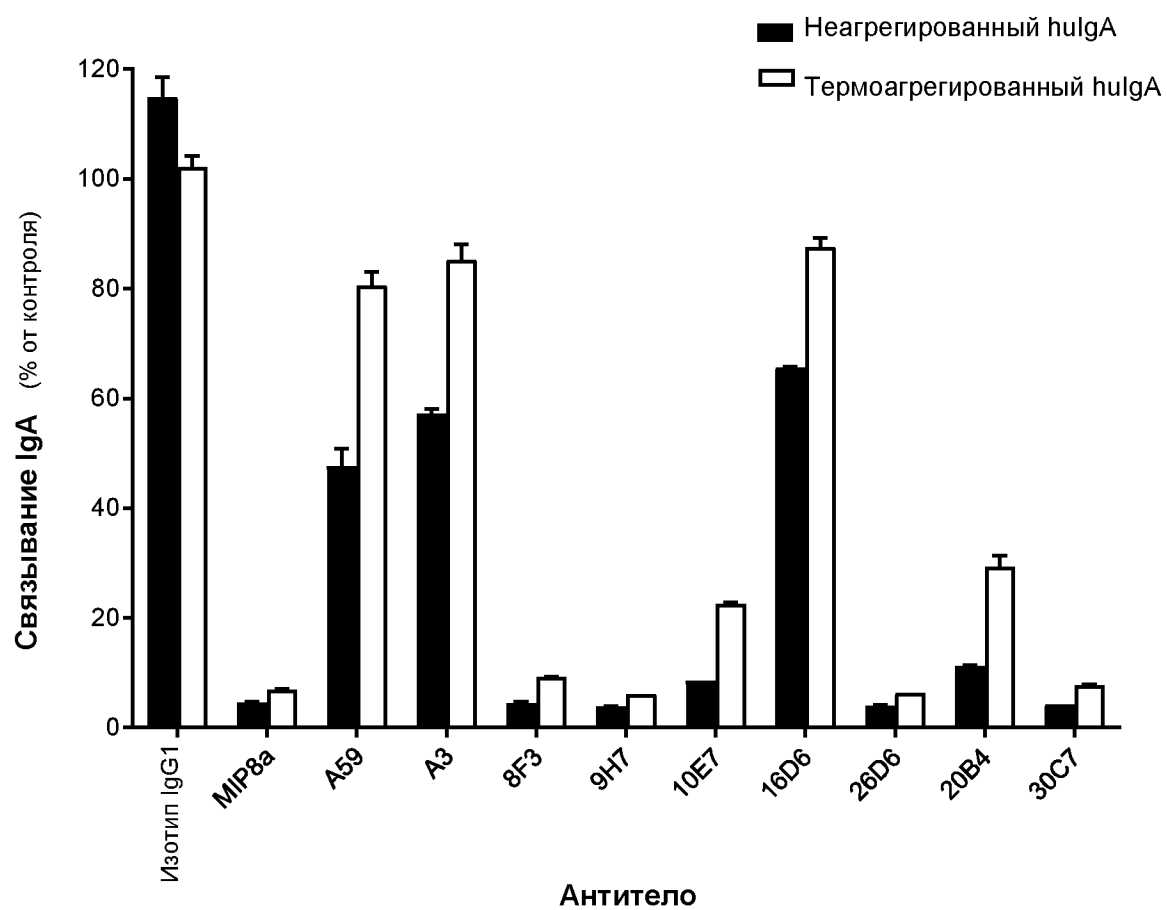
Фигура 5В



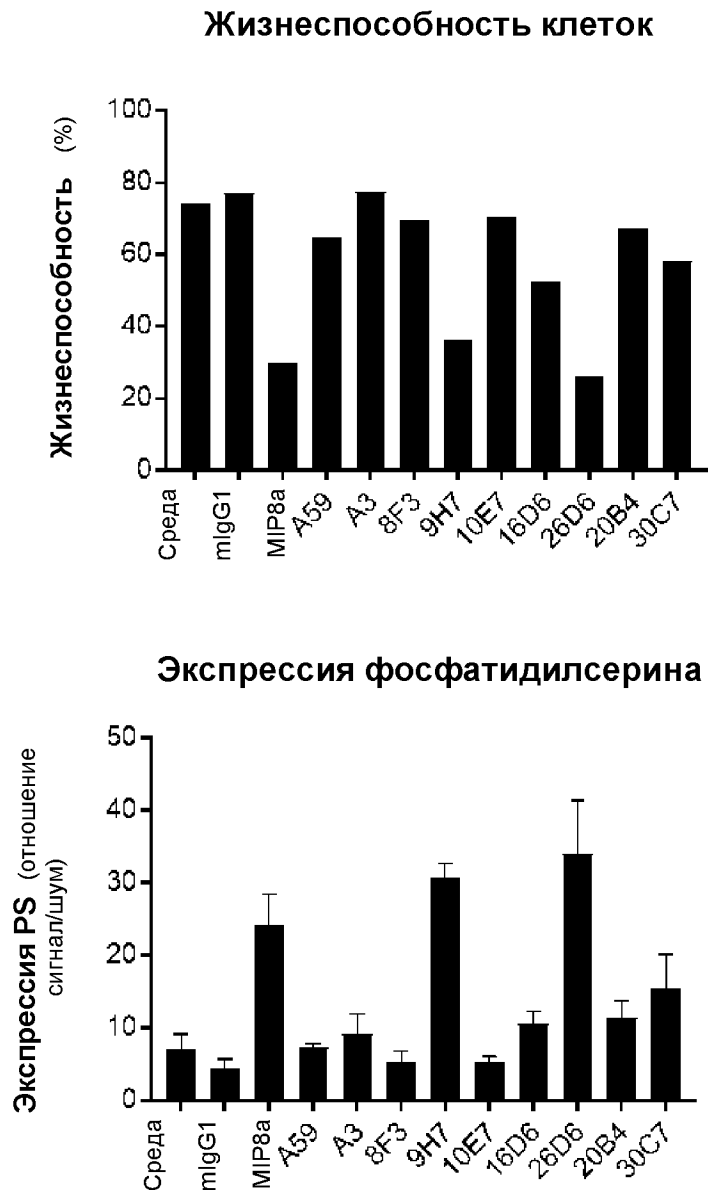
Фигура 5С



Фигура 5D

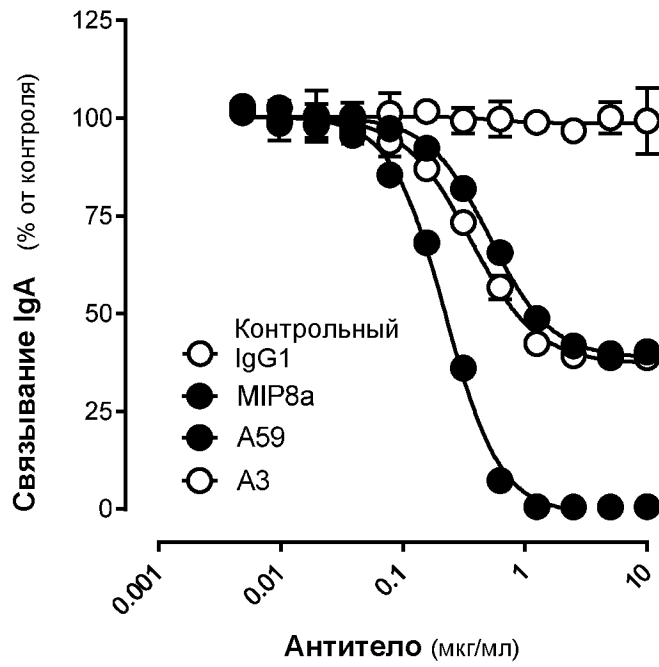


Фигура 5Е

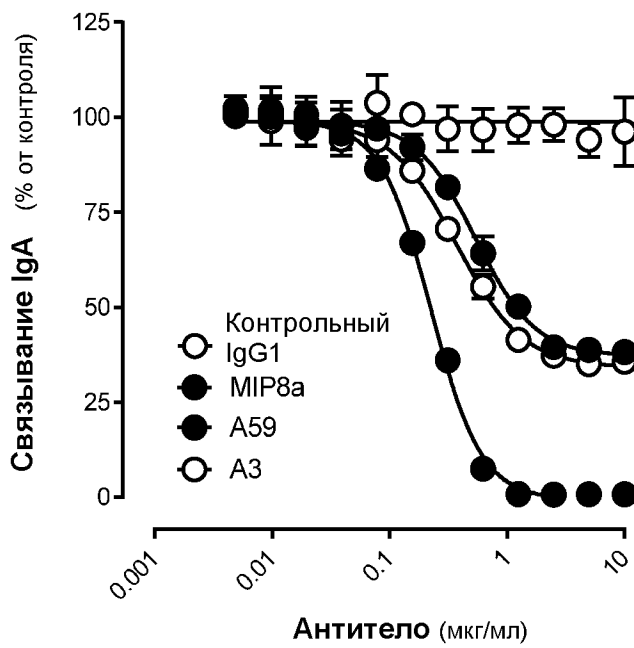


Фигура 6

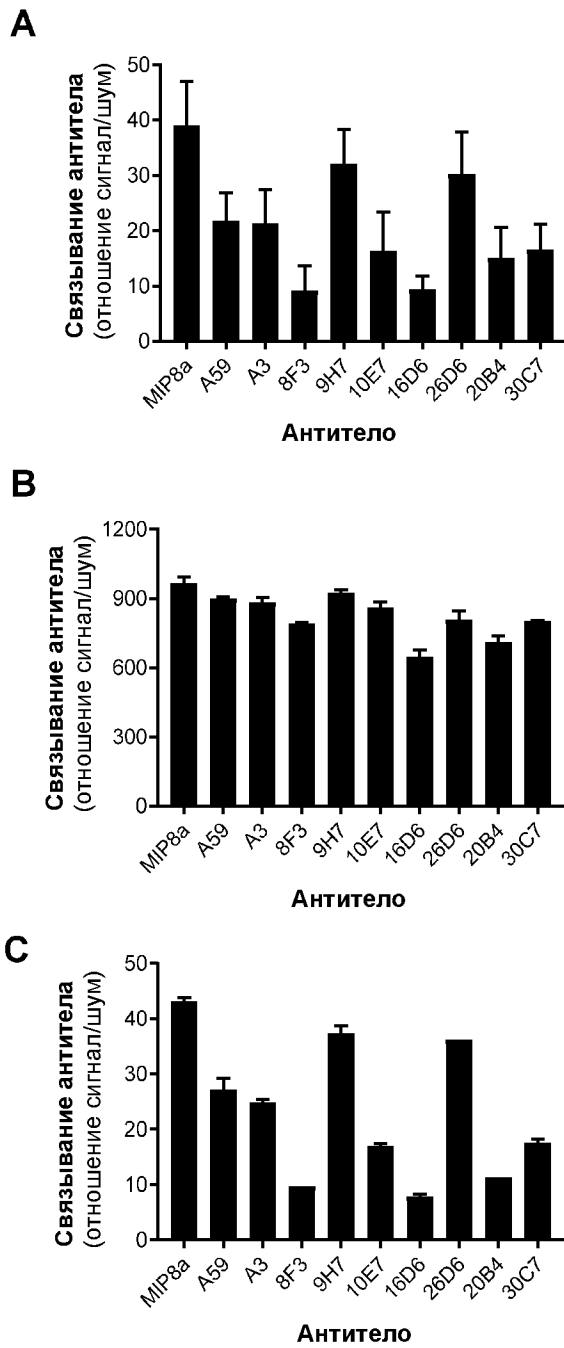
А



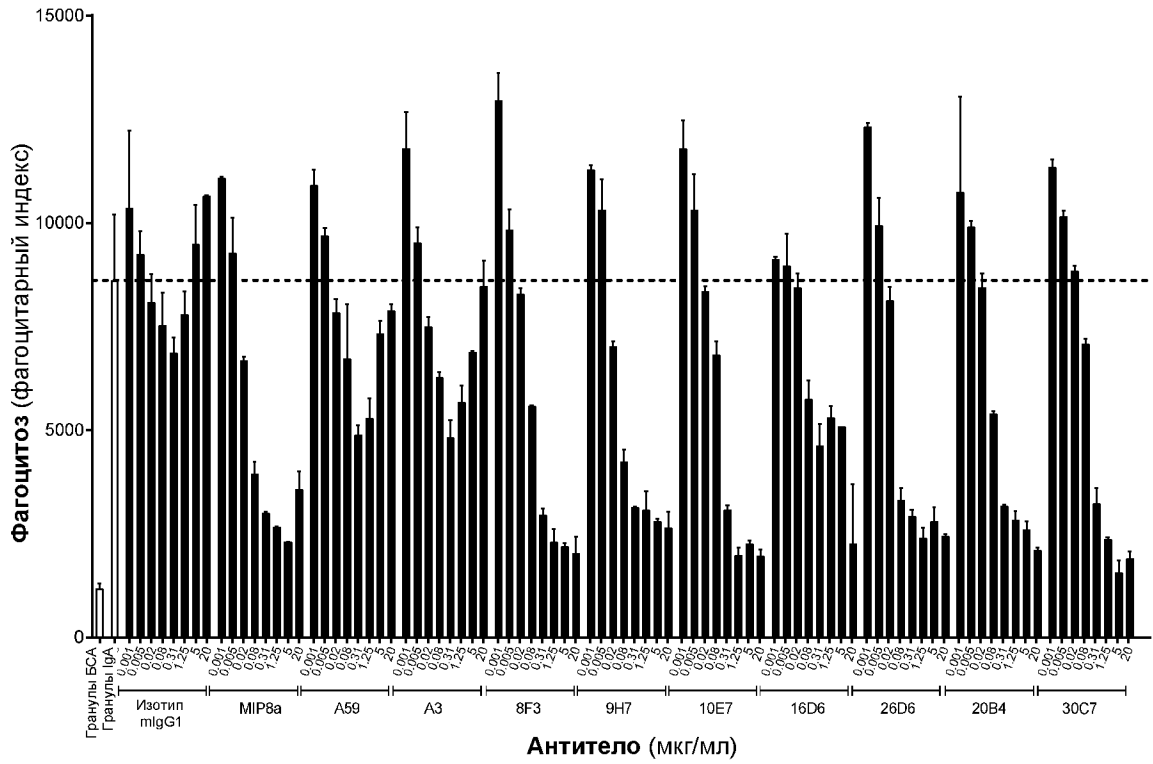
В



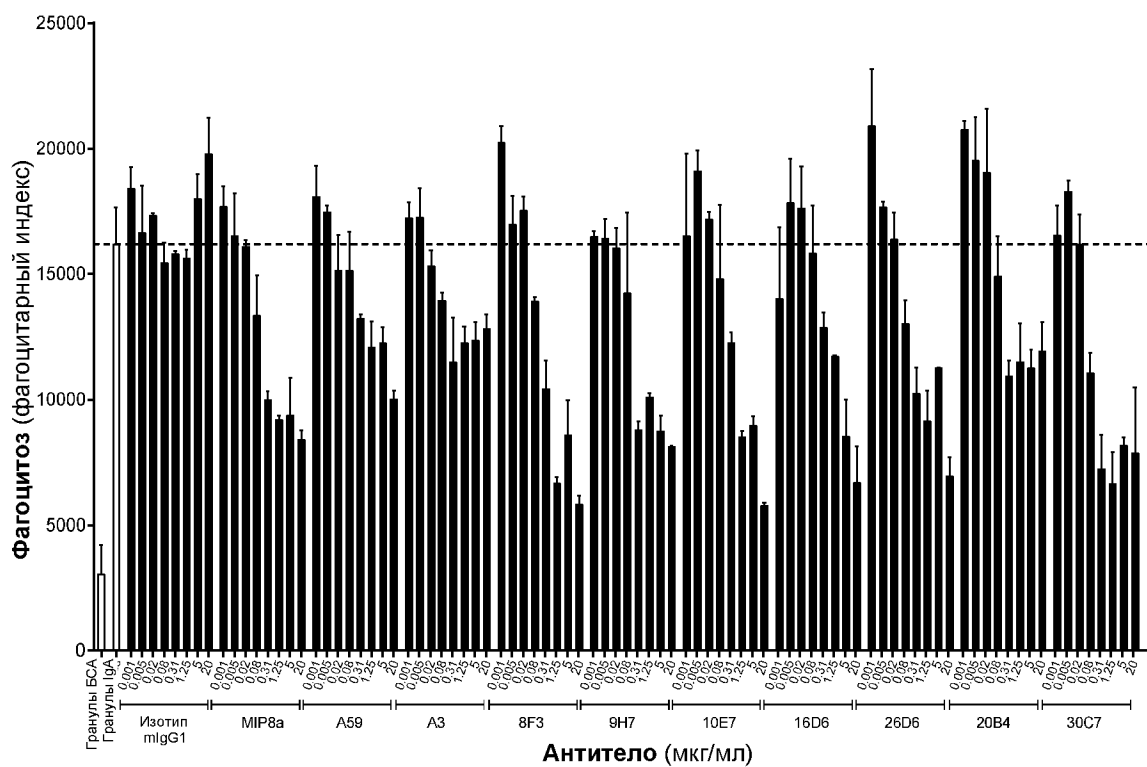
Фигура 7



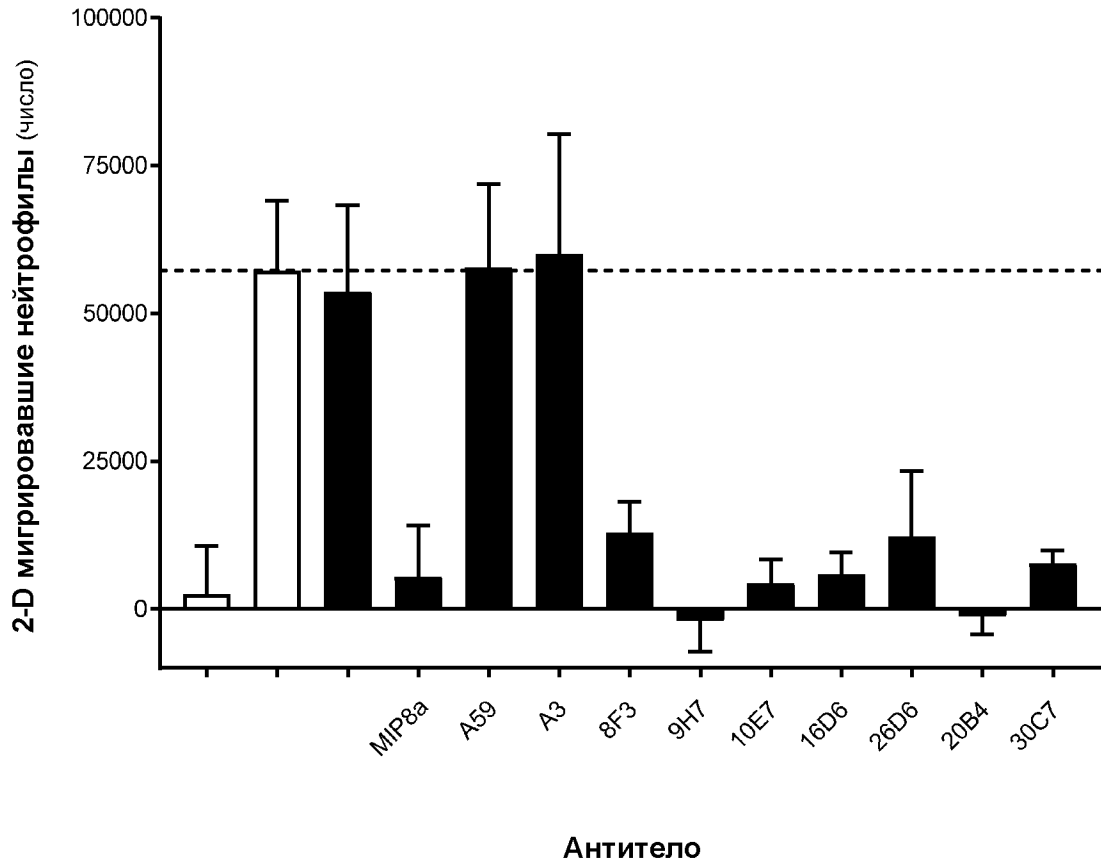
Фигура 8 (Донор 2)



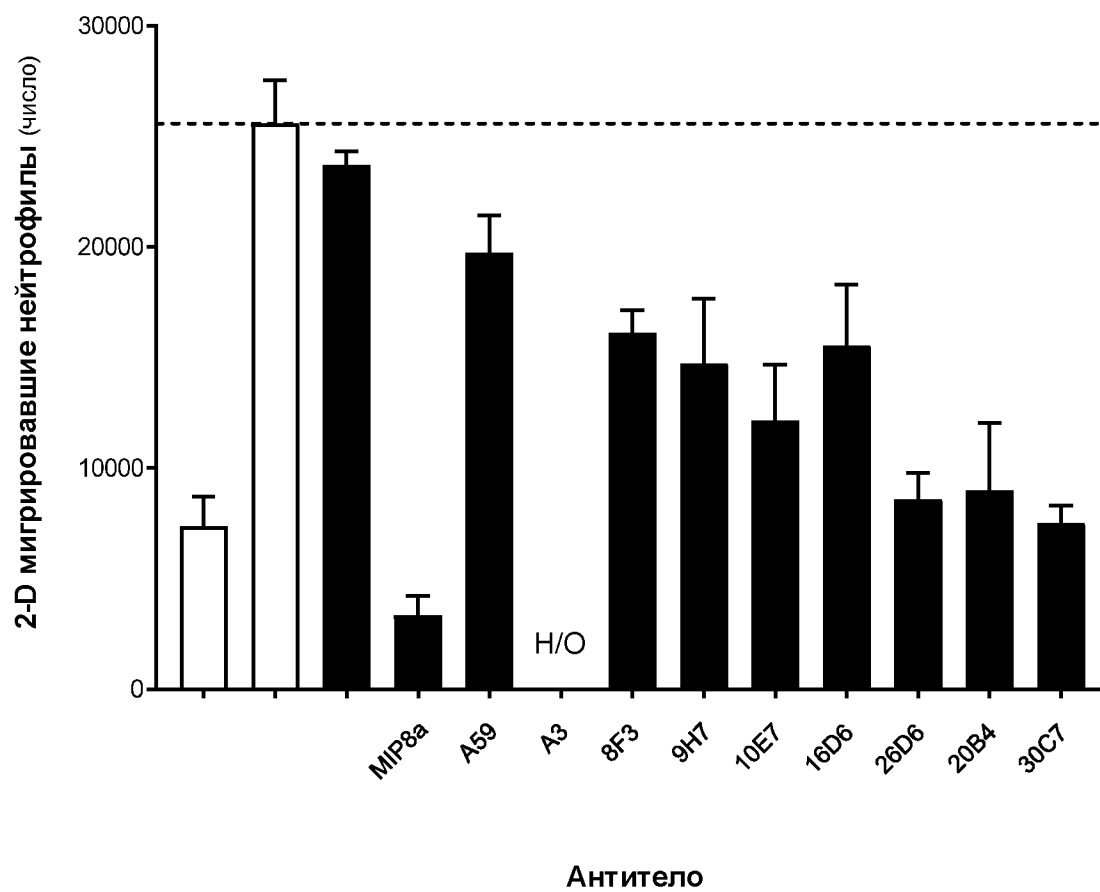
Фигура 8 (Донор 3)



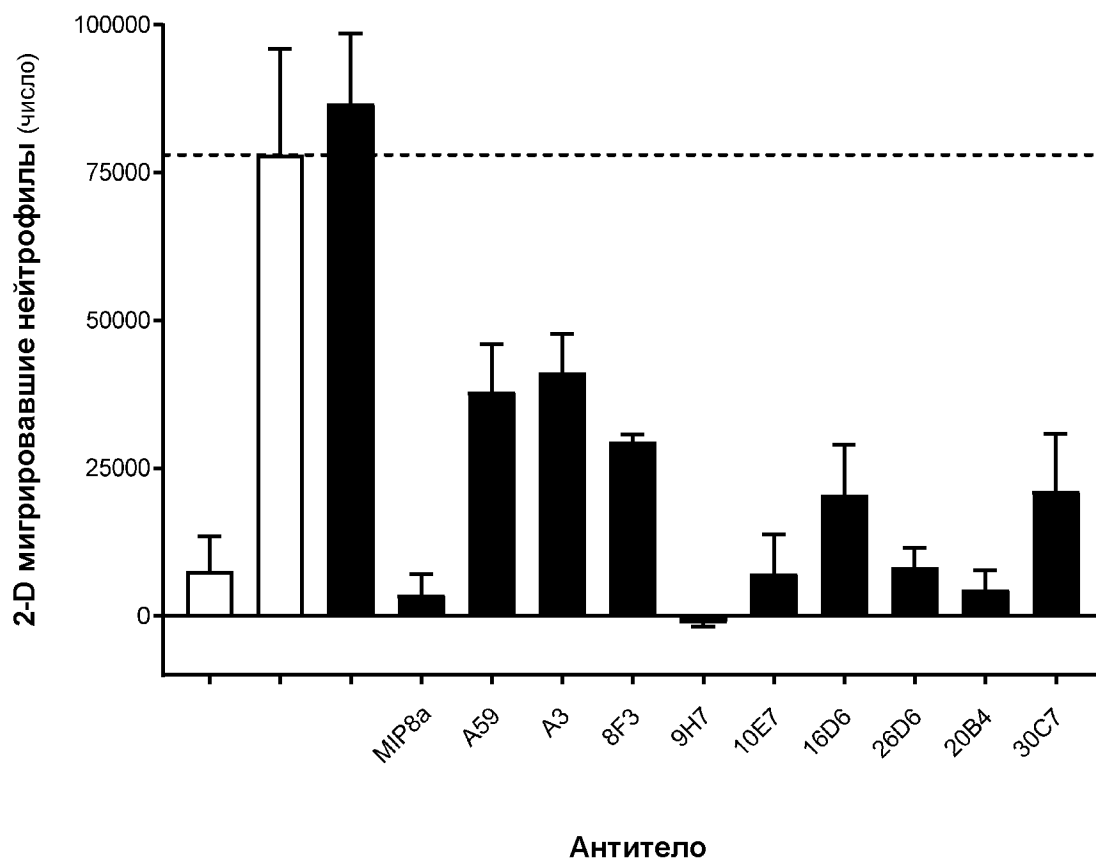
Фигура 9А (Донор 1)



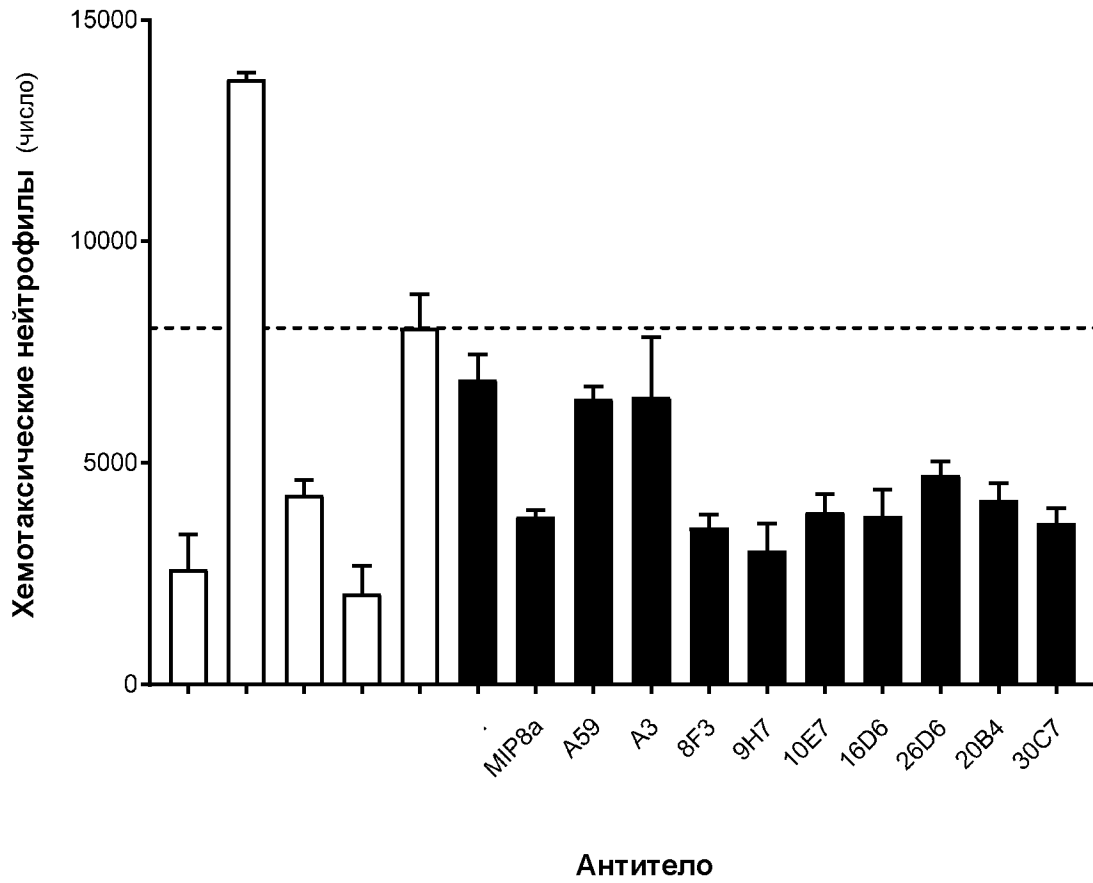
Фигура 9А (Донор 2)



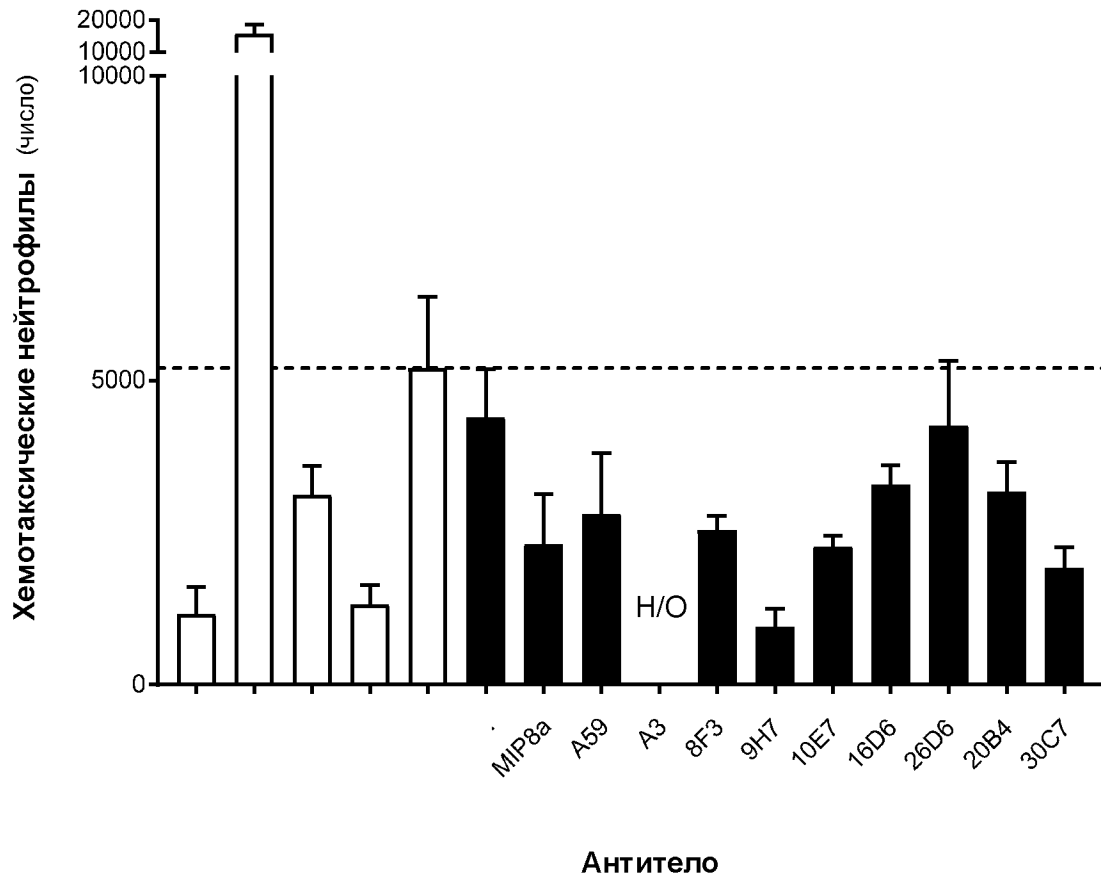
Фигура 9А (Донор 3)



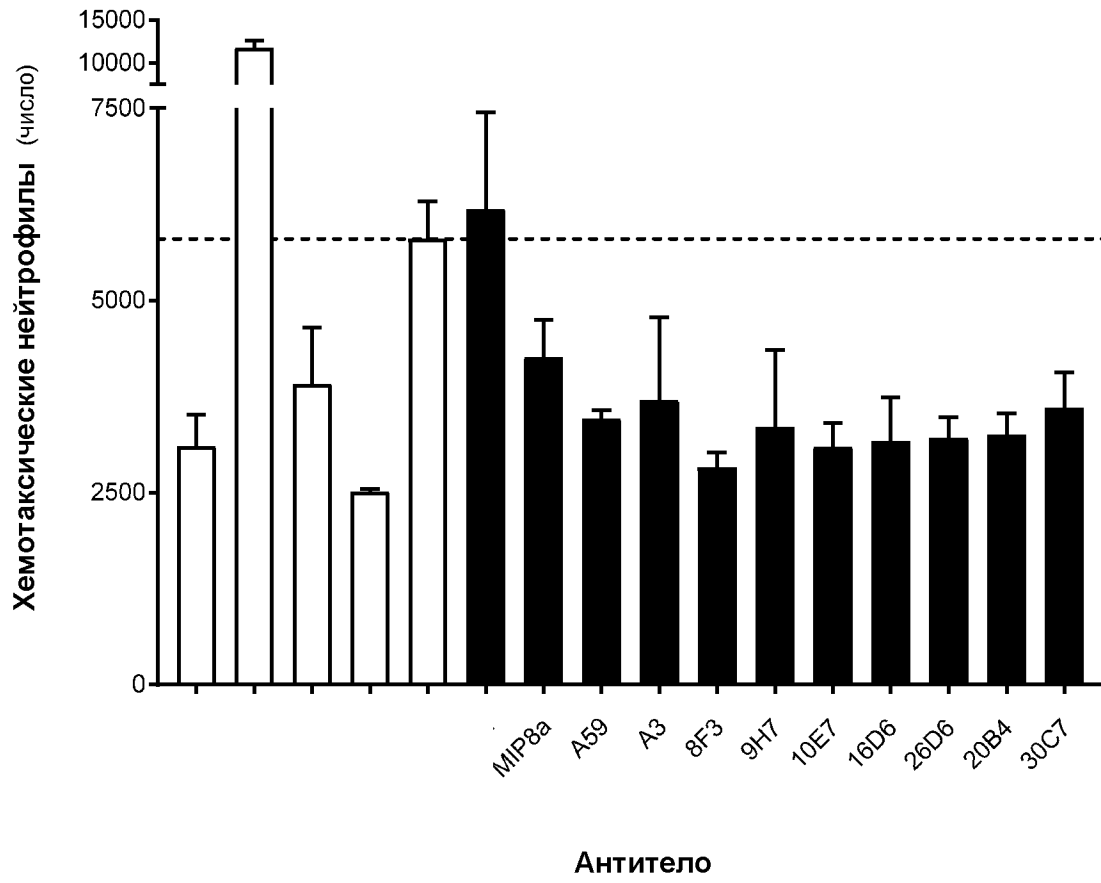
Фигура 9В (Донор 1)



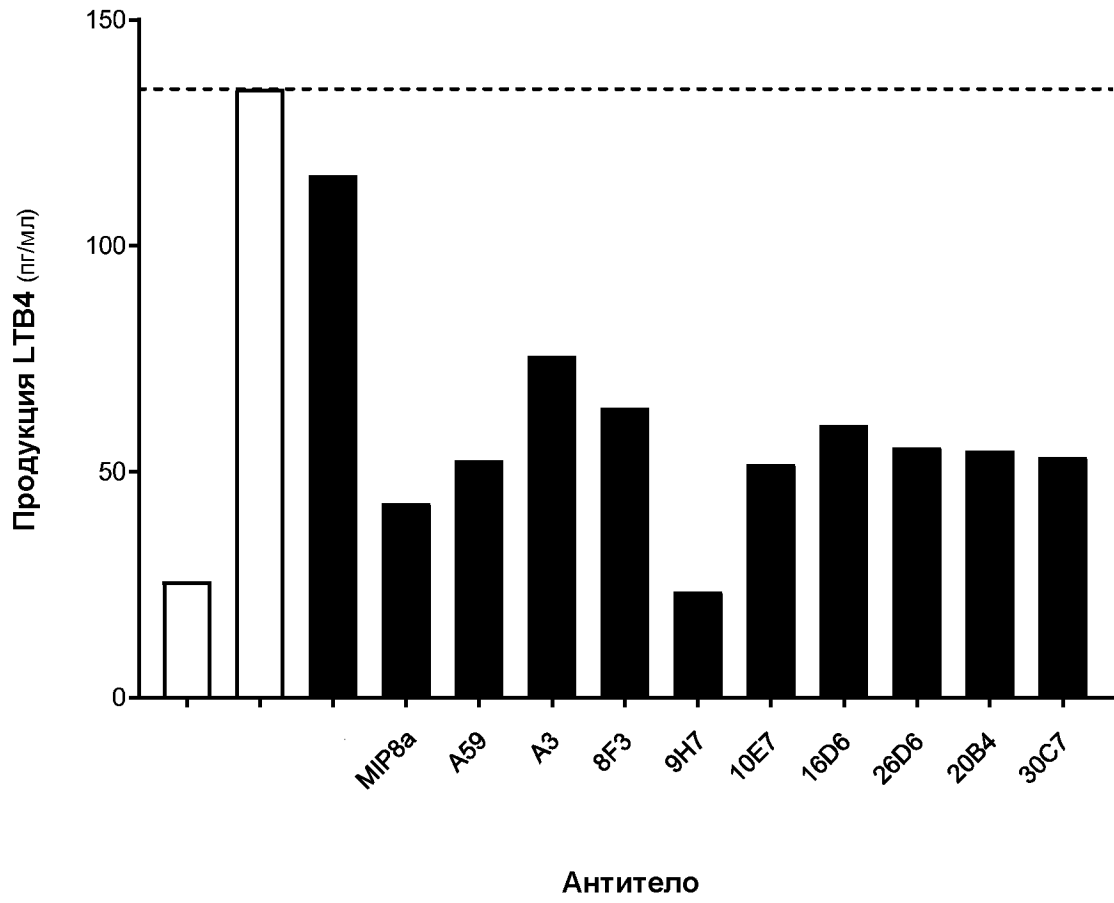
Фигура 9В (Донор 2)



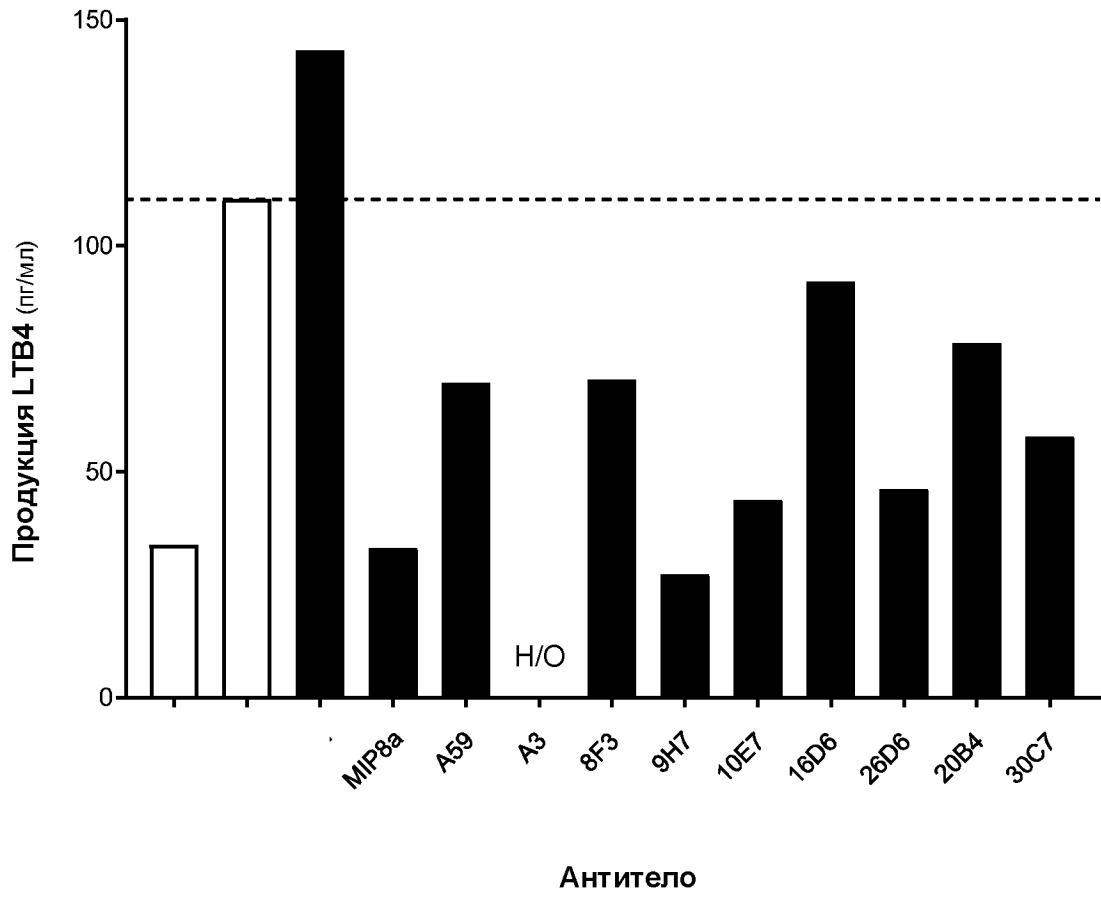
Фигура 9В (Донор 3)



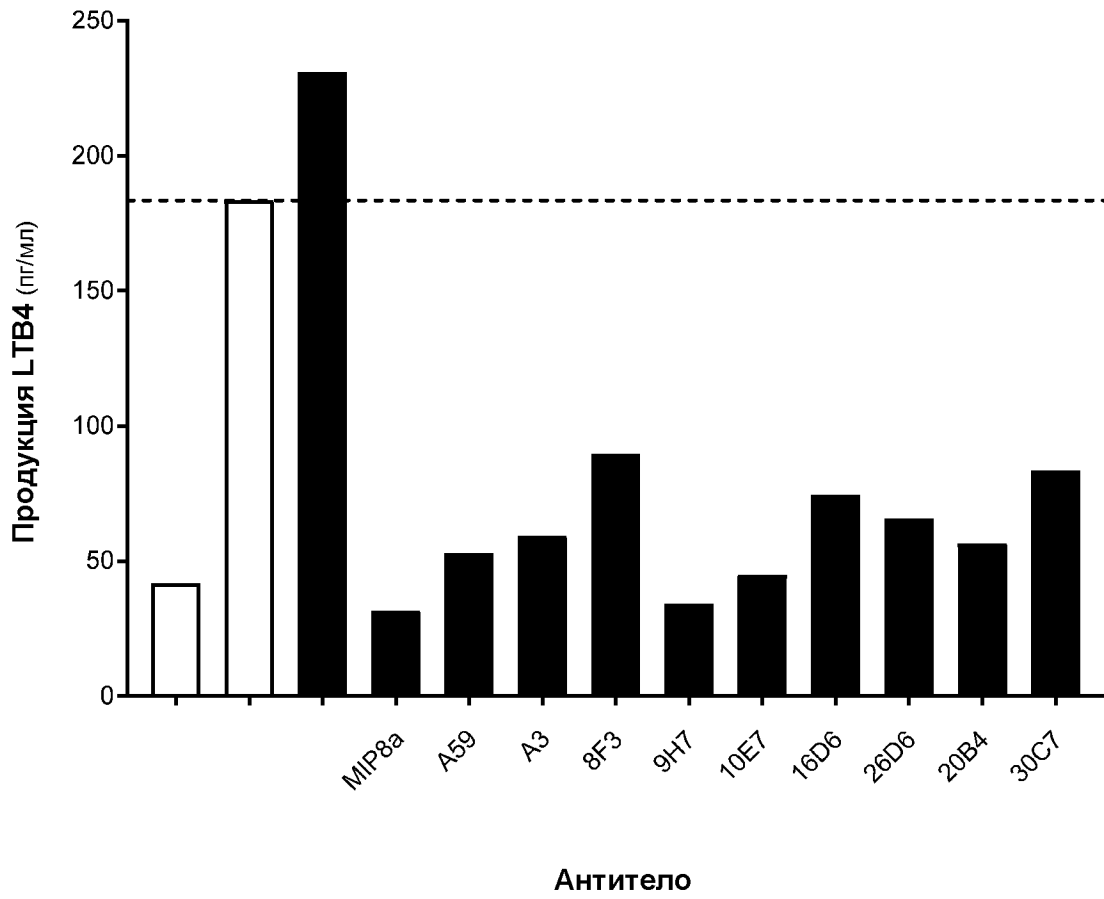
Фигура 9С (Донор 1)



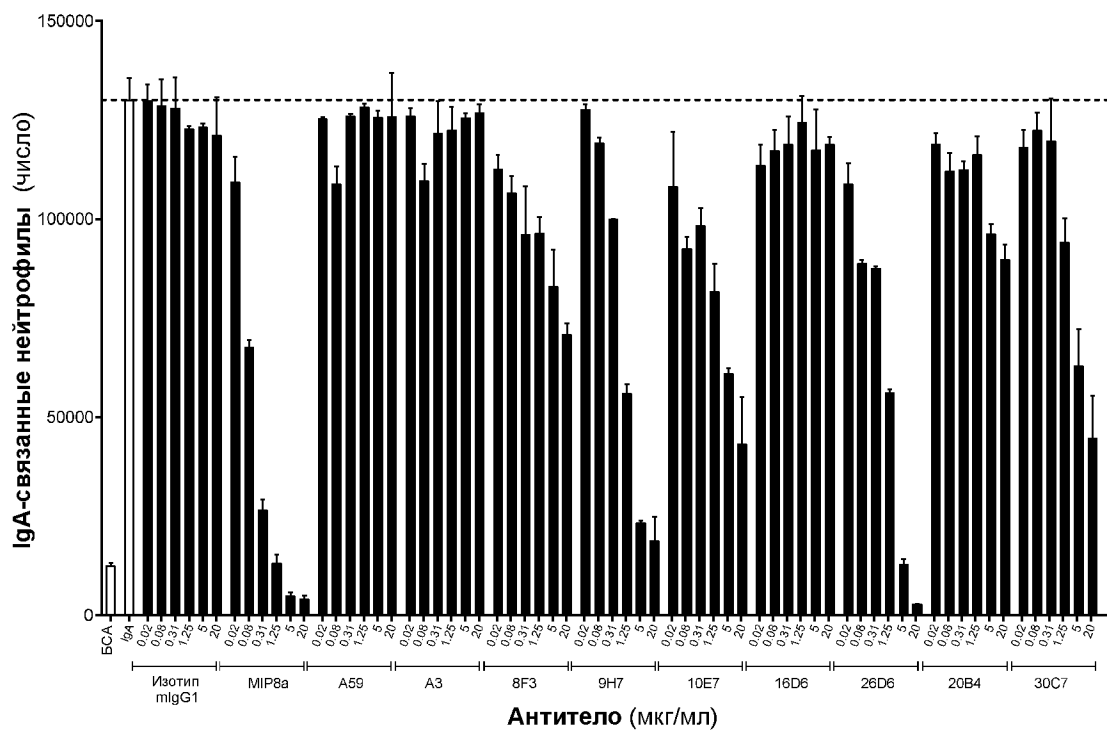
Фигура 9С (Донор 2)



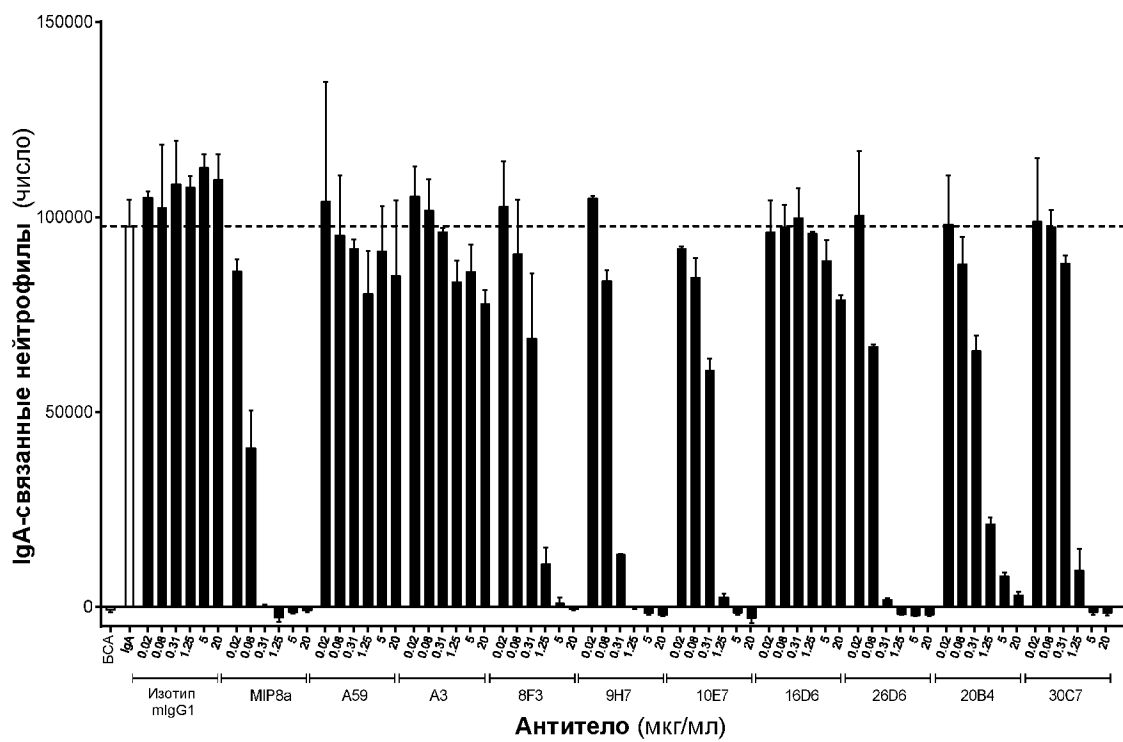
Фигура 9С (Донор 3)



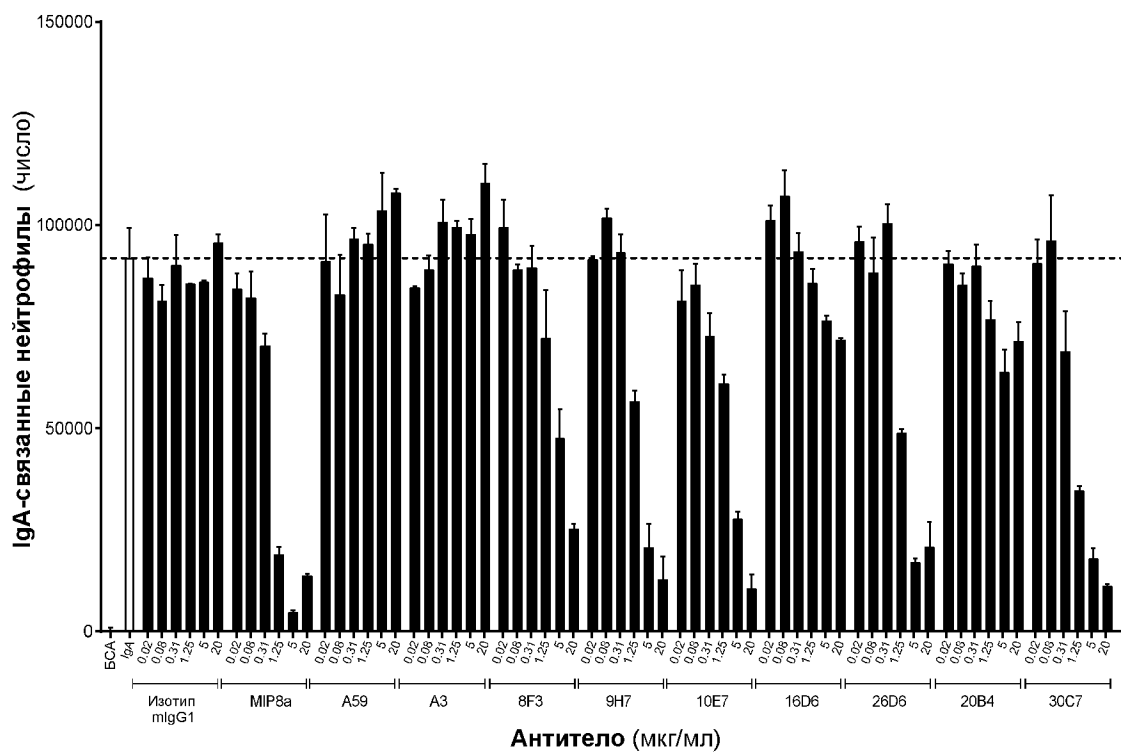
Фигура 10А (Донор 1)



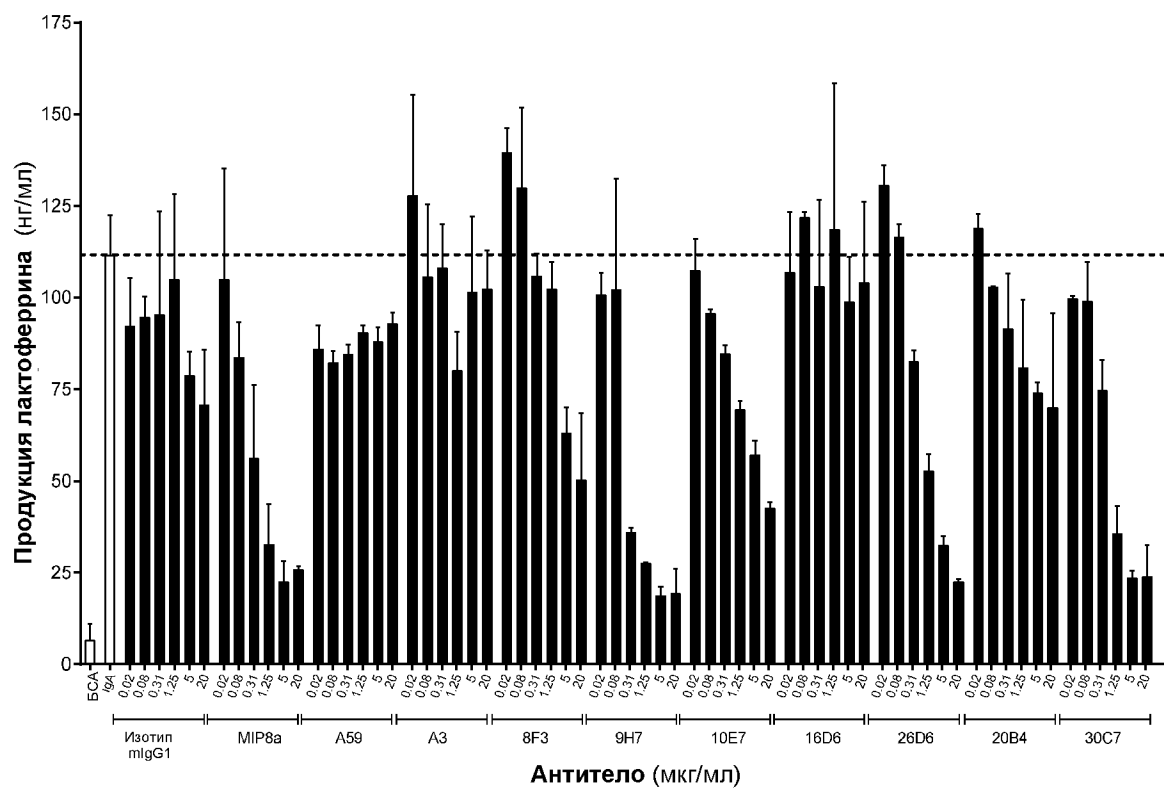
Фигура 10А (Донор 2)



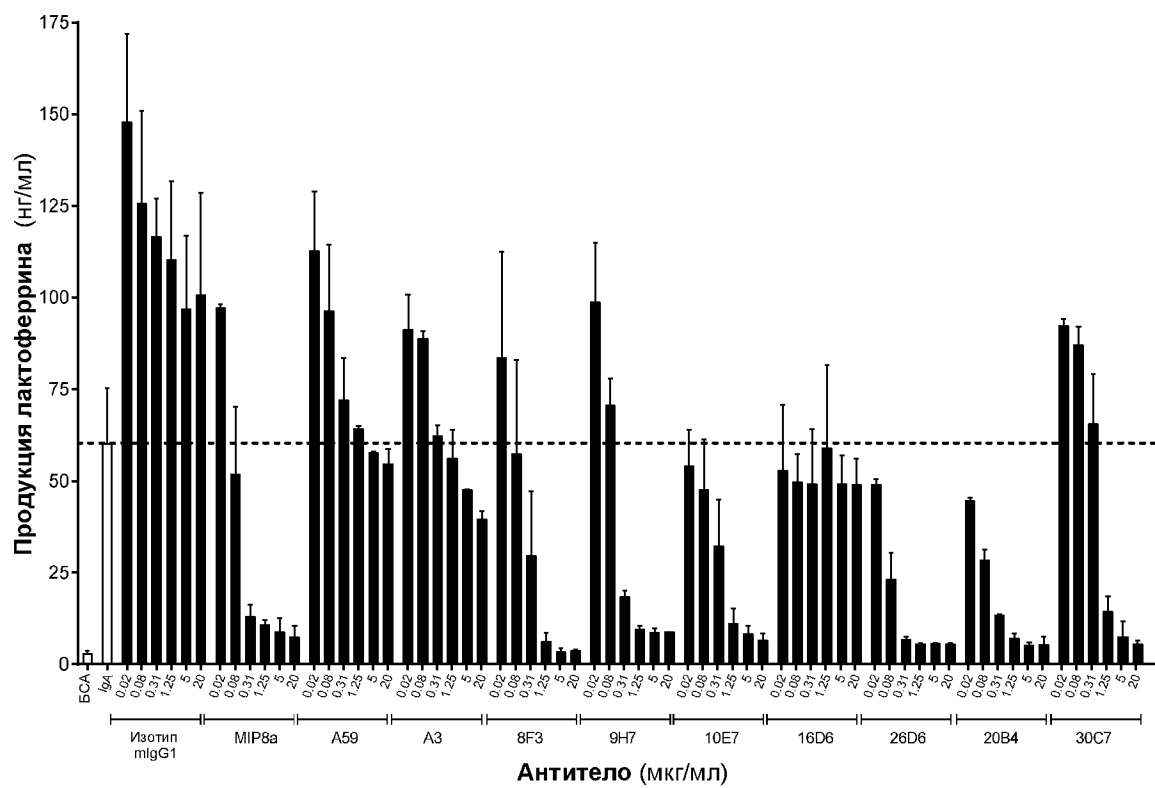
Фигура 10А (Донор 3)



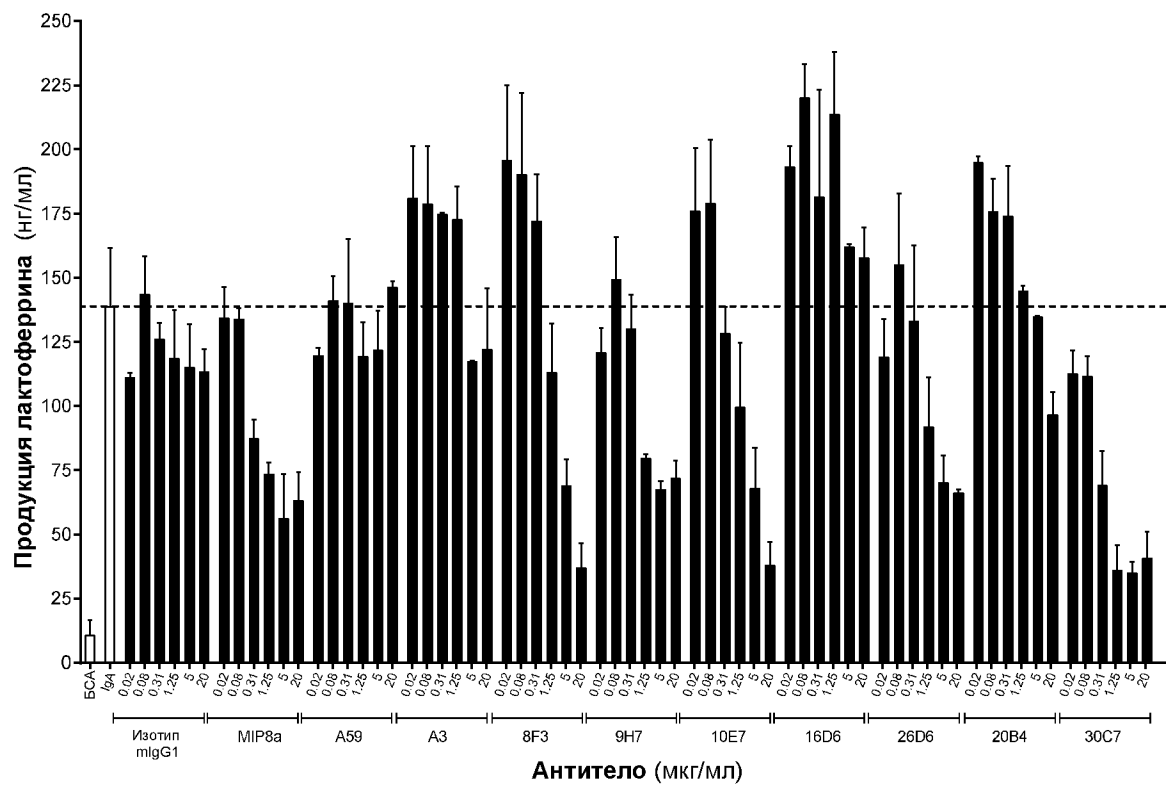
Фигура 10В (Донор 1)



Фигура 10В (Донор 2)

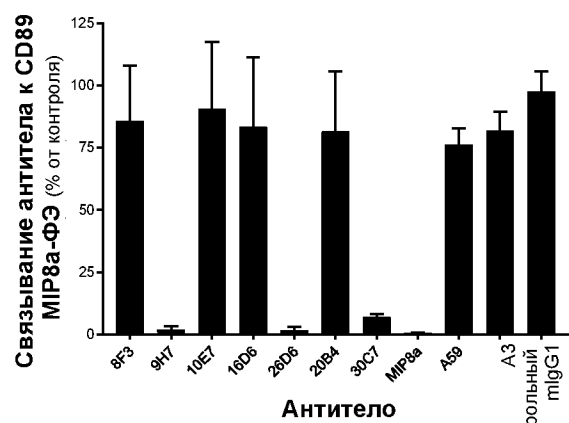


Фигура 10В (Донор 3)

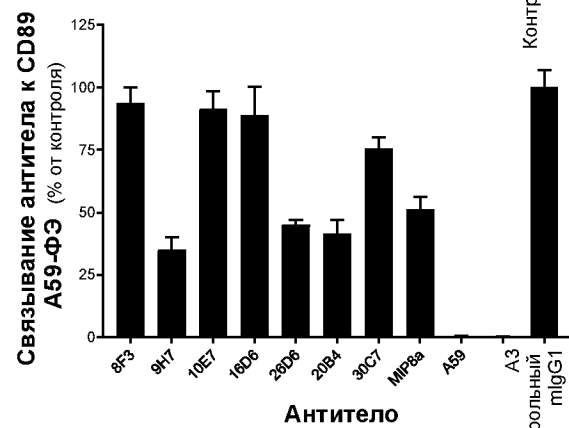


Фигура 11

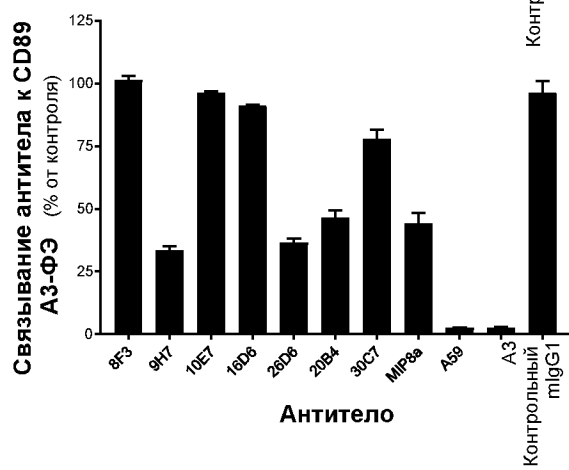
А



В

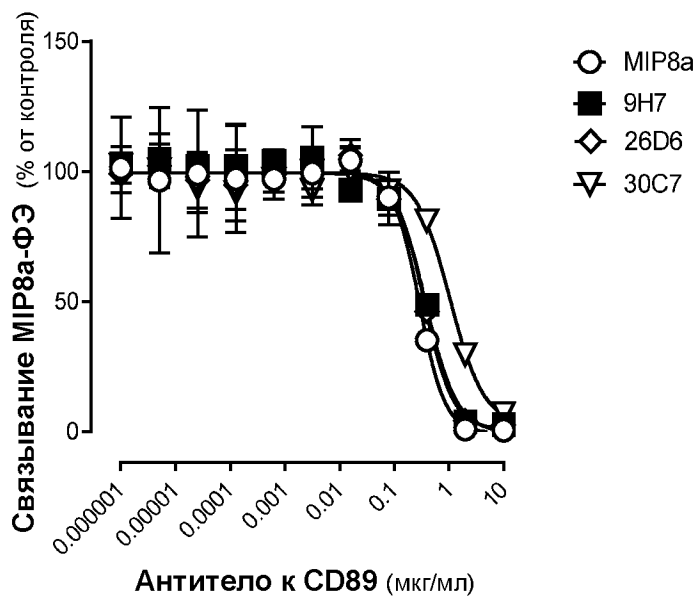


С

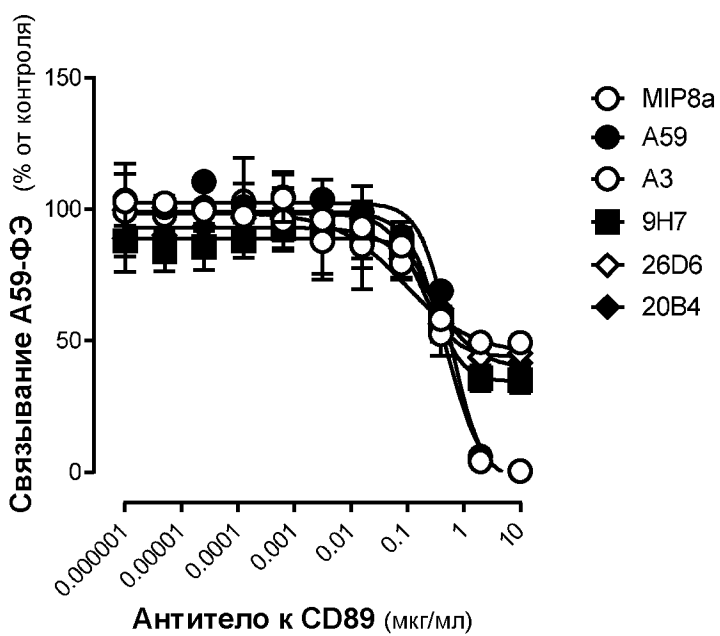


Фигура 12

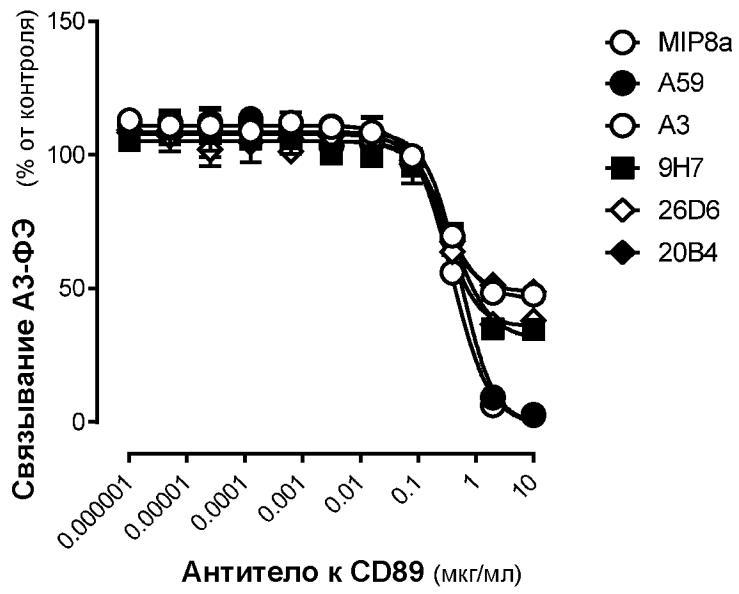
А



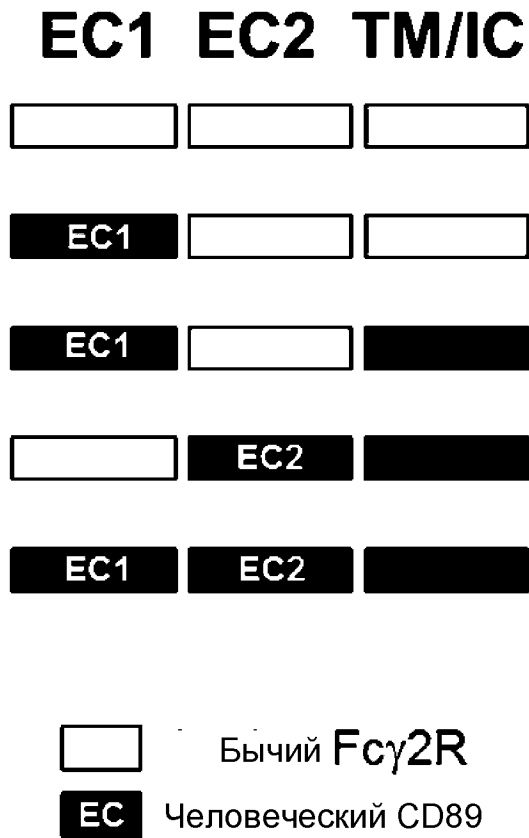
В

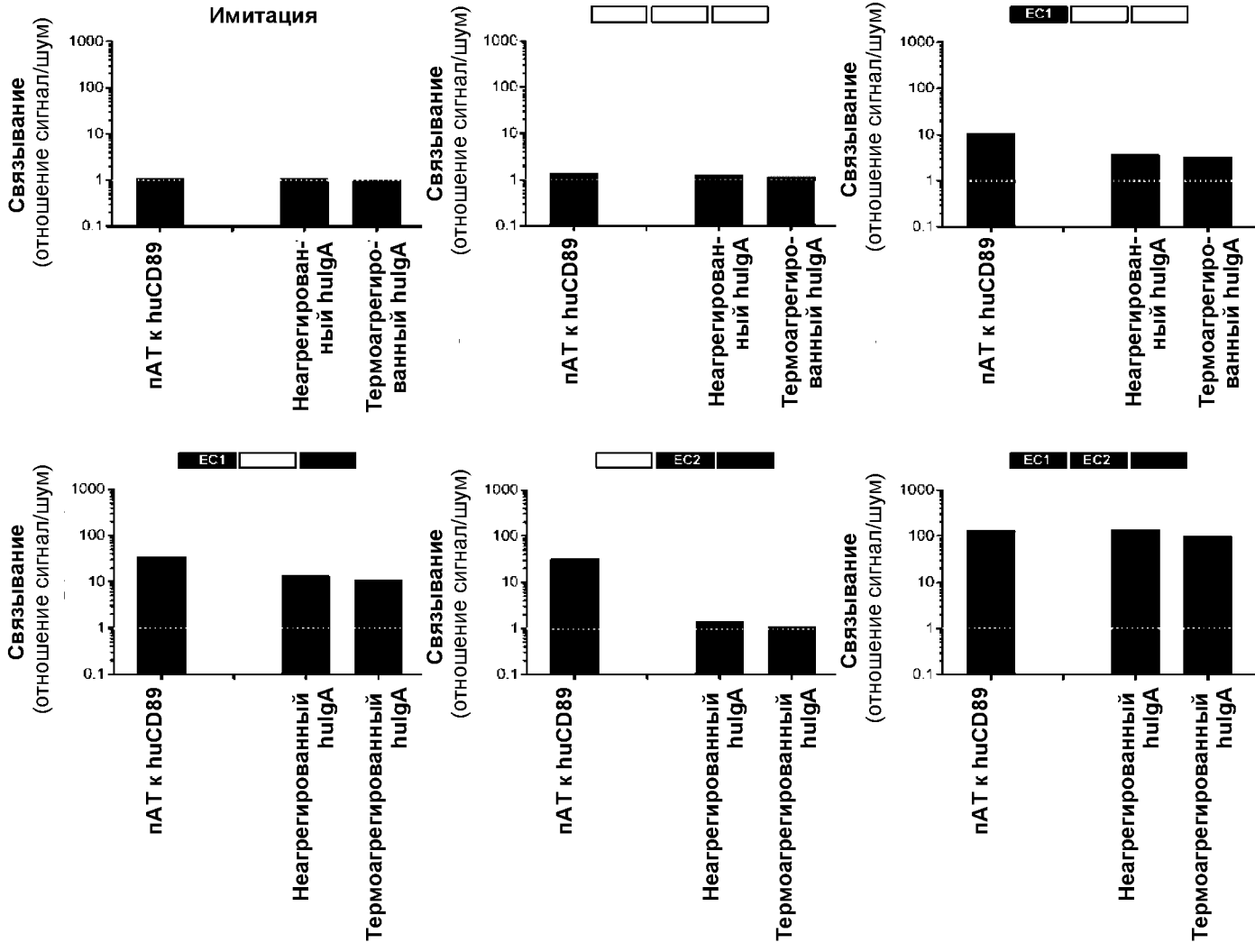


Фигура 12С

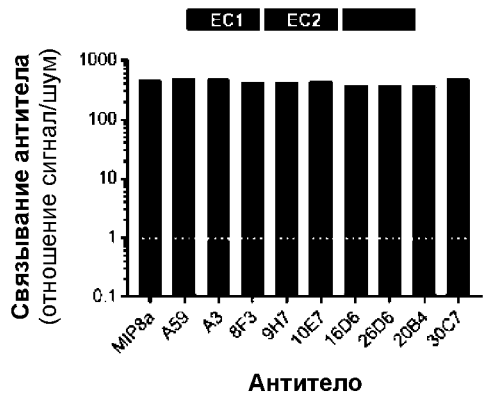
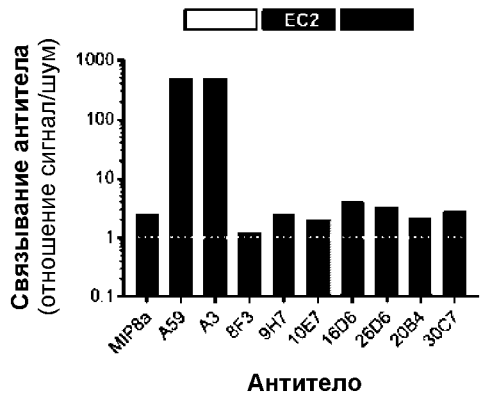
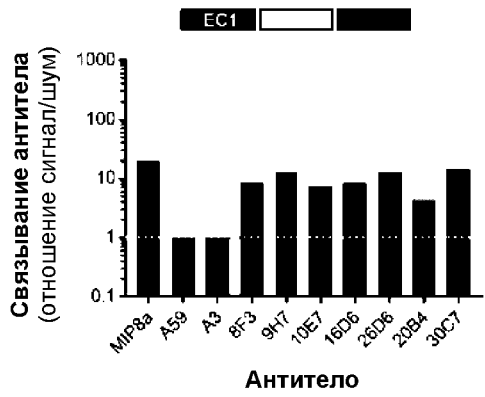
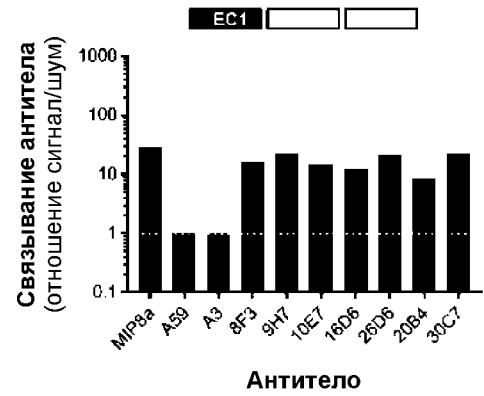
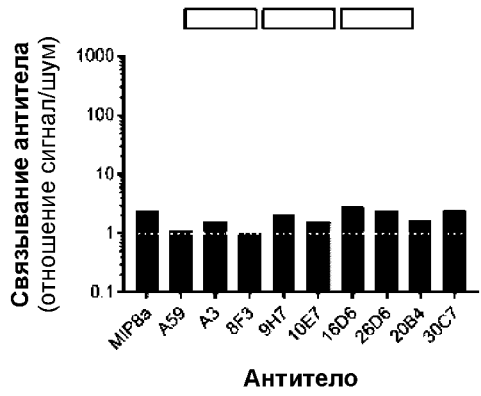
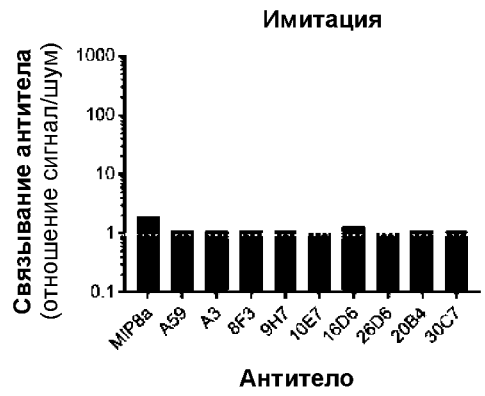


Фигура 13А



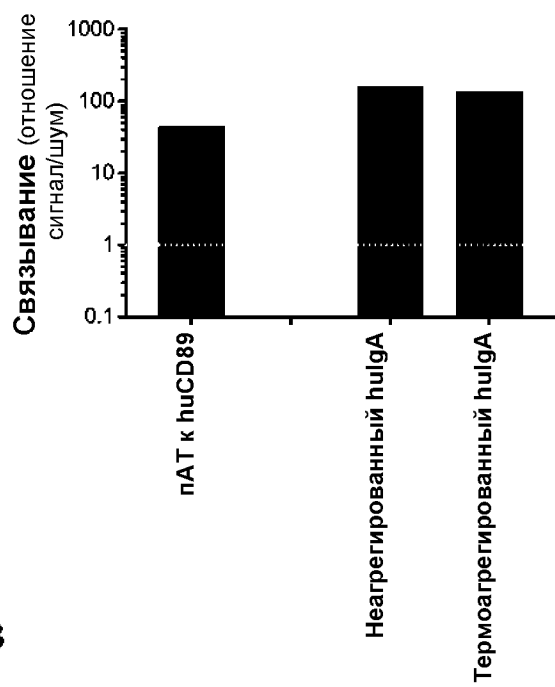
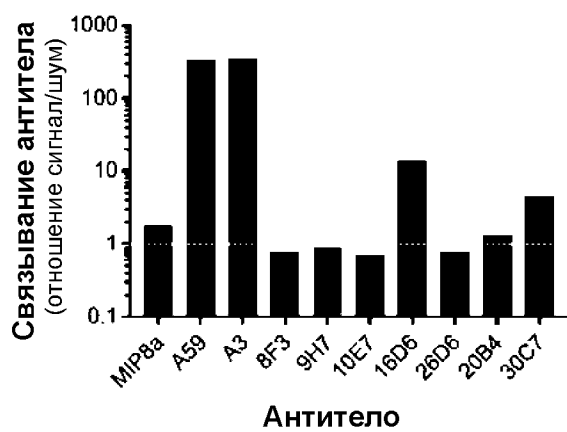


Фигура 13В

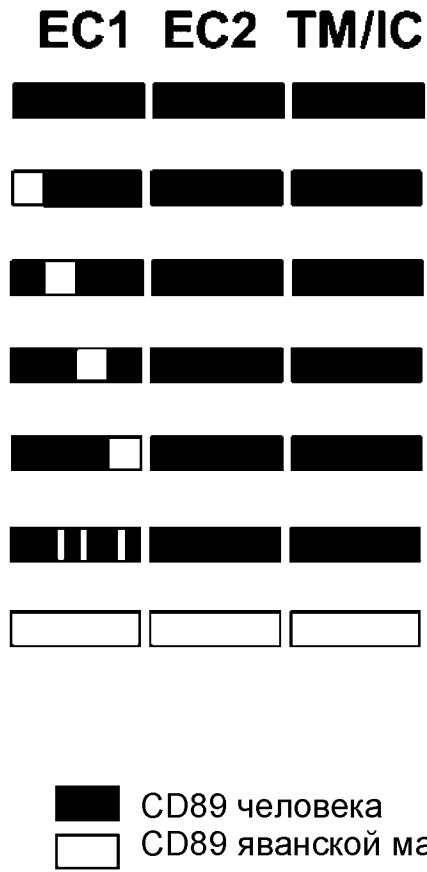


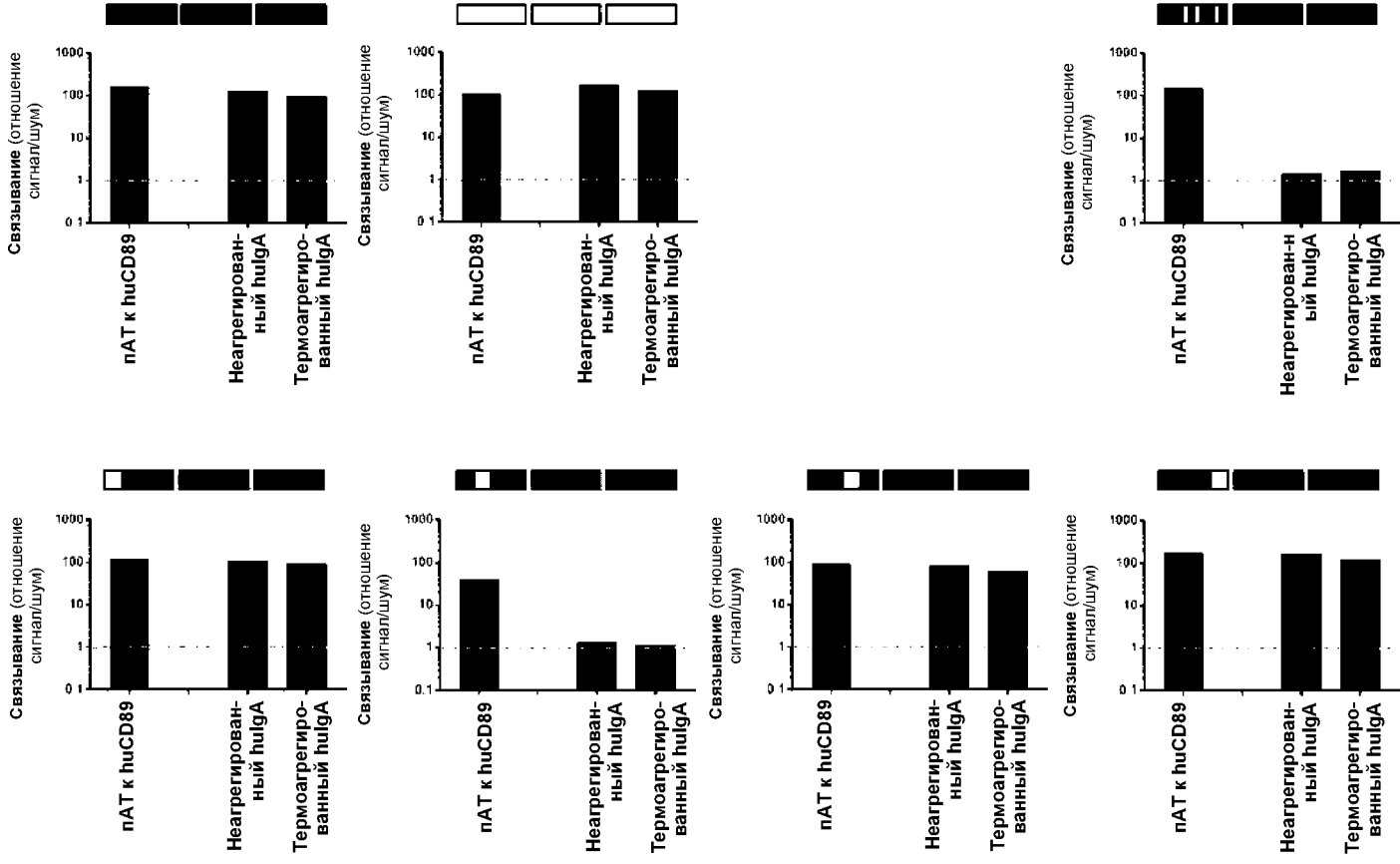
Фигура 13С

Фигура 14

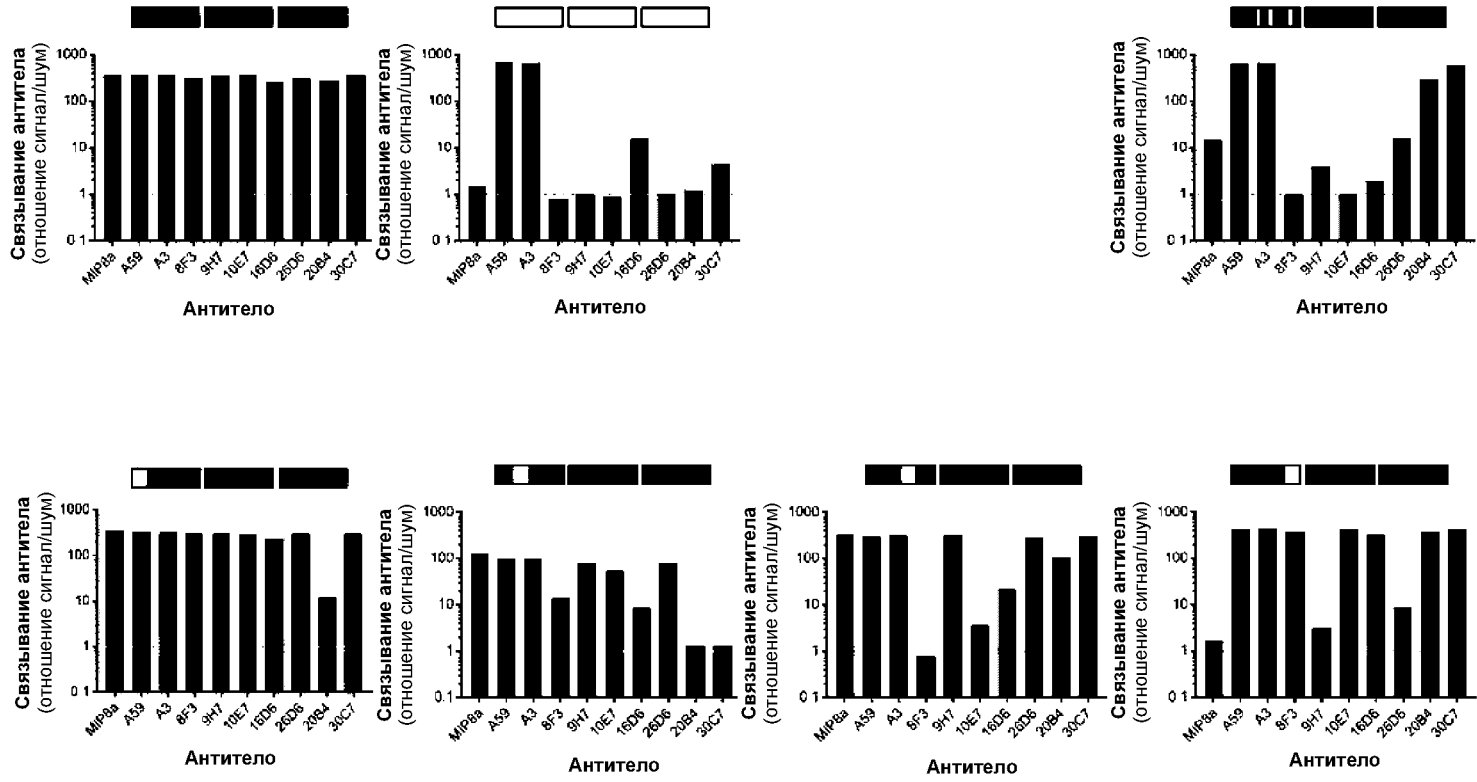
A**B**

Фигура 15А





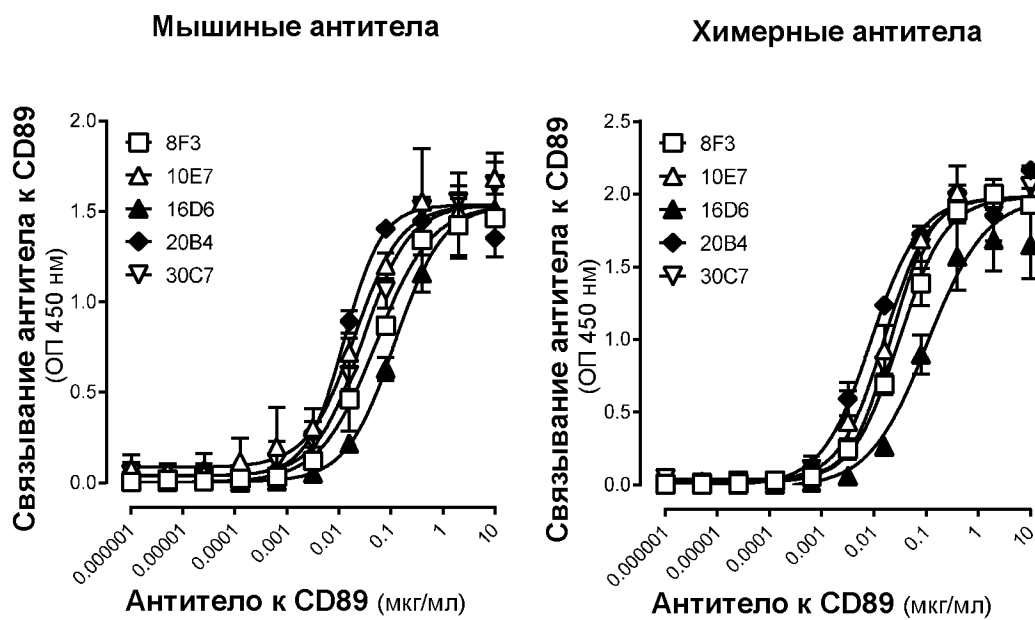
Фигура 15В



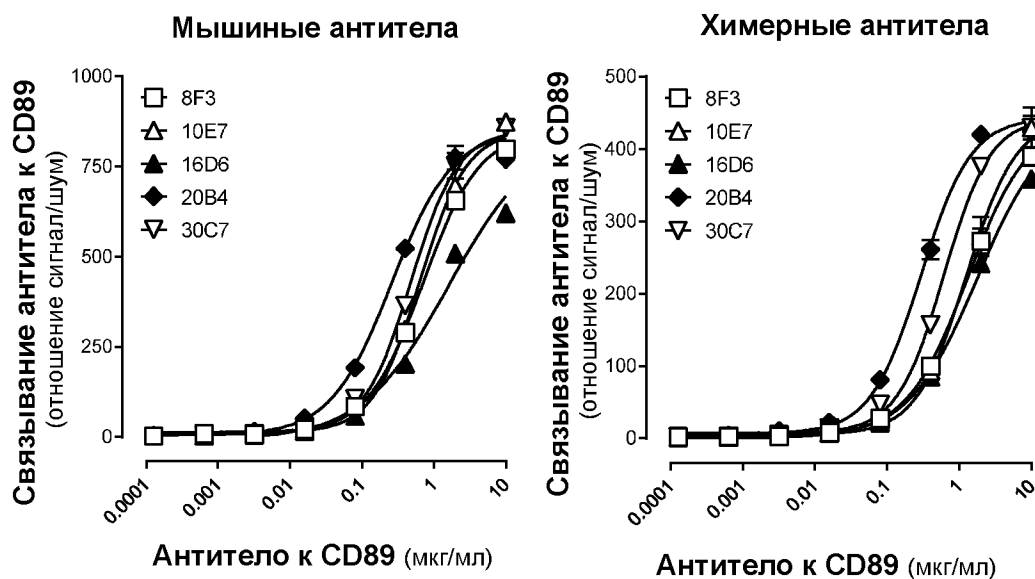
Фигура 15С

Фигура 16

А

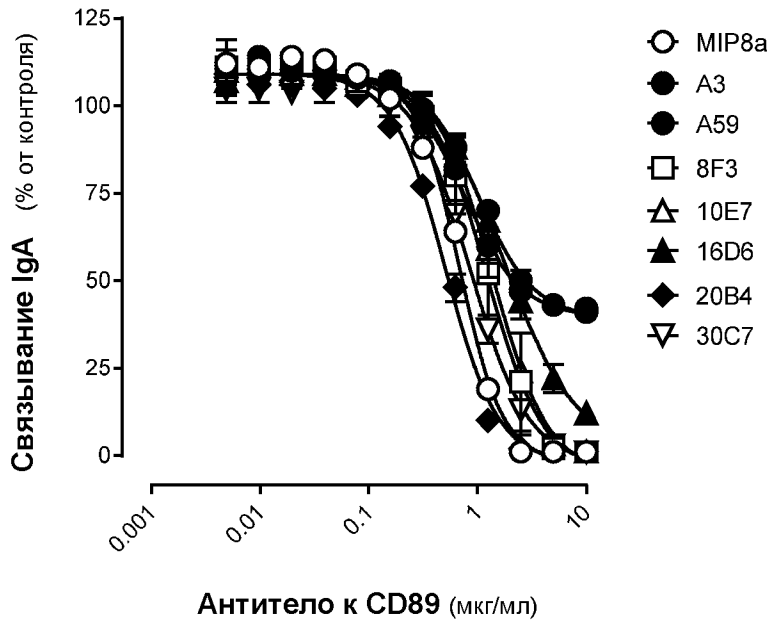


В

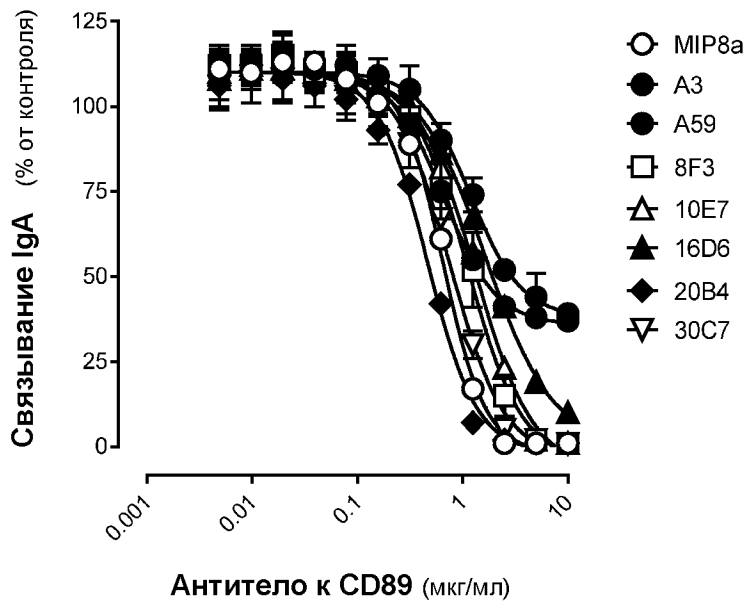


Фигура 17

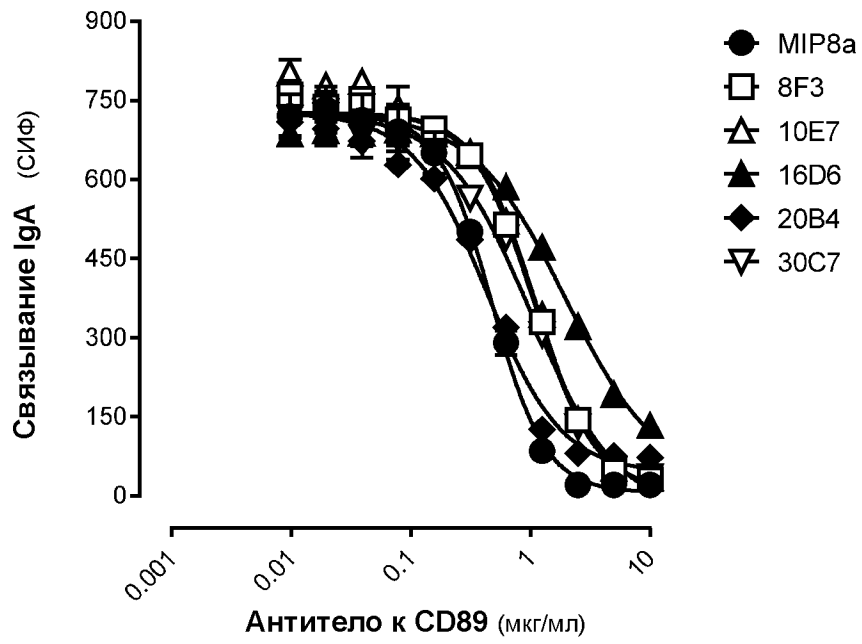
А



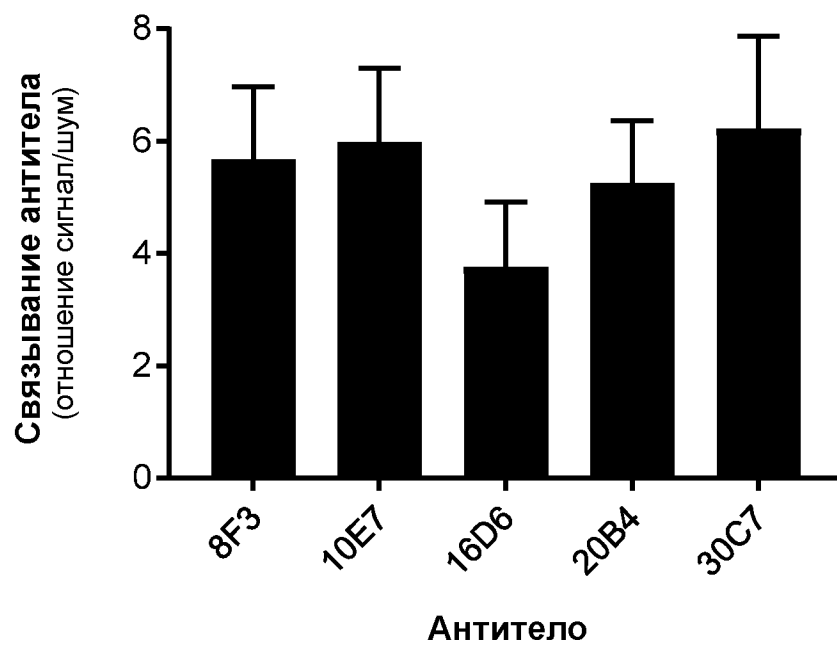
В



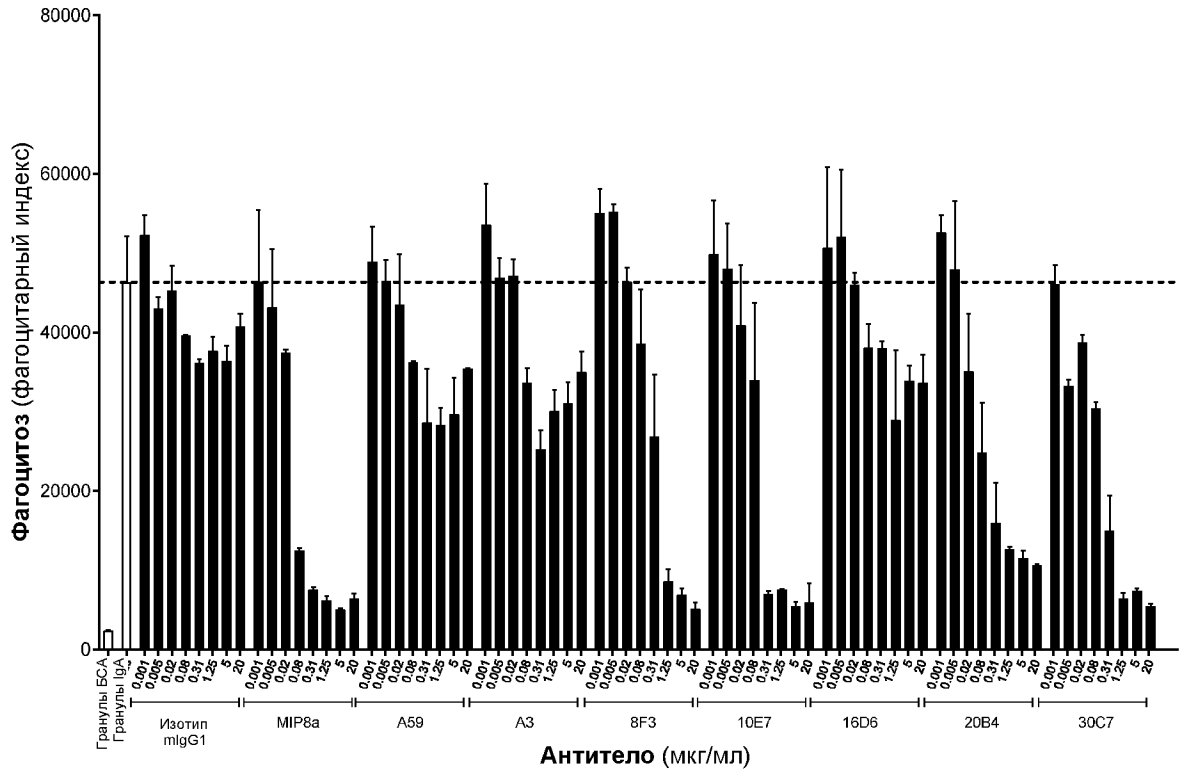
Фигура 17С



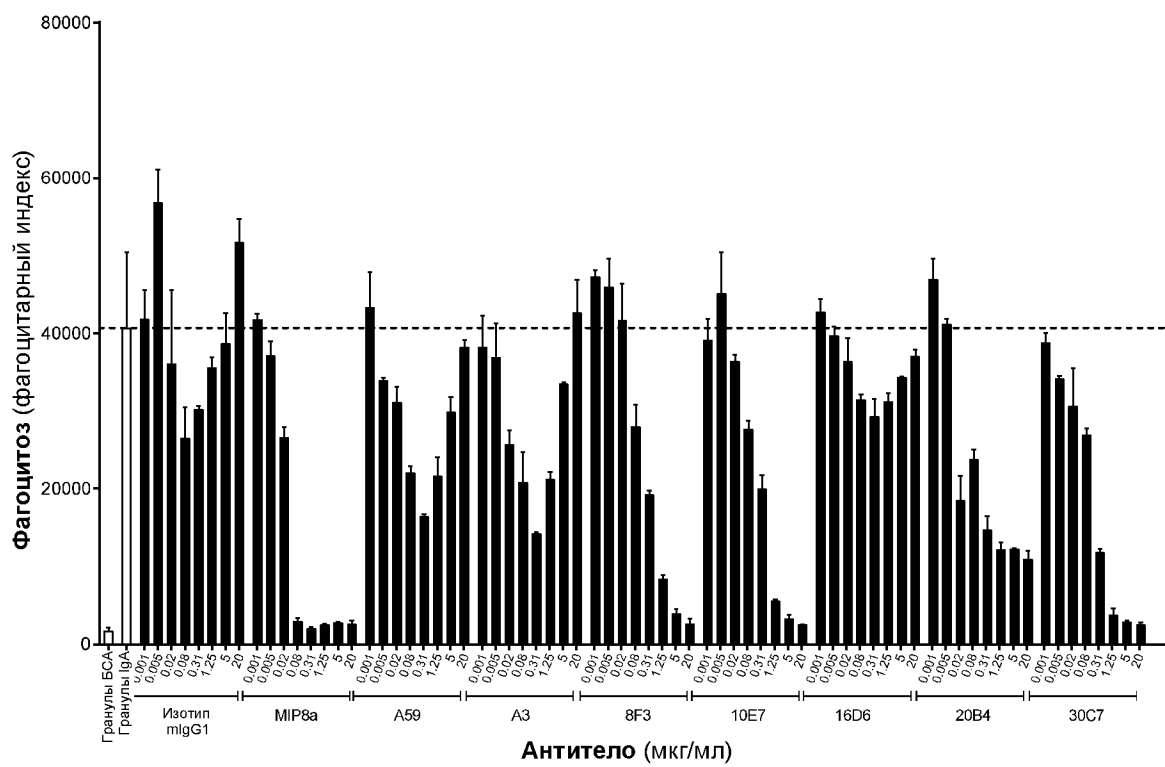
Фигура 18



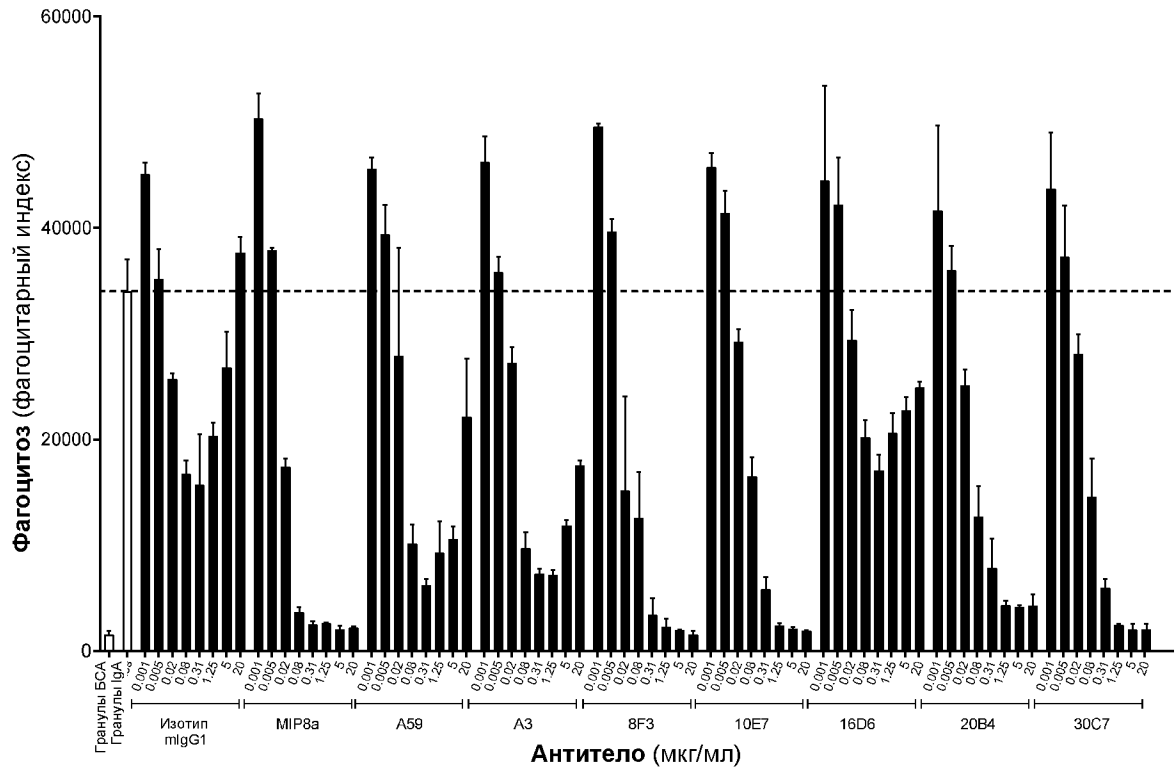
Фигура 19 (Донор 1)



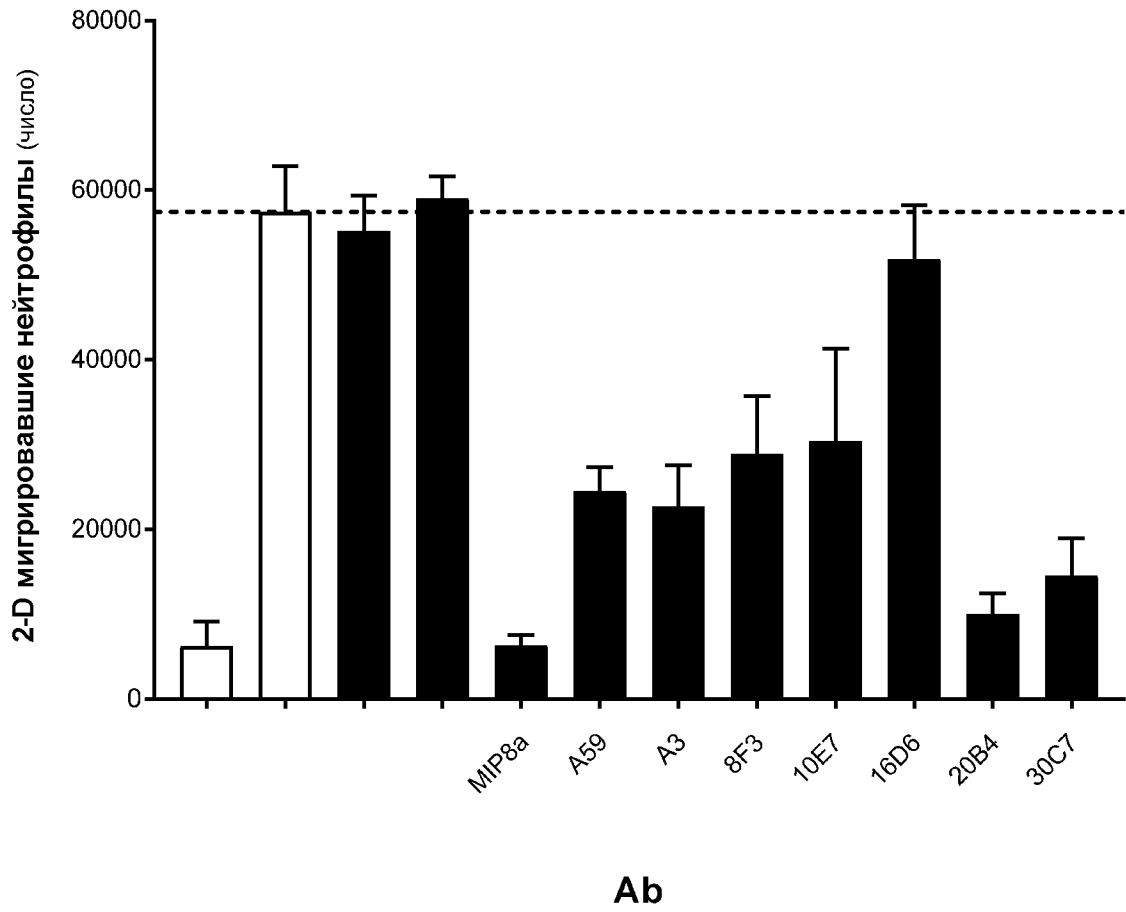
Фигура 19 (Донор 2)



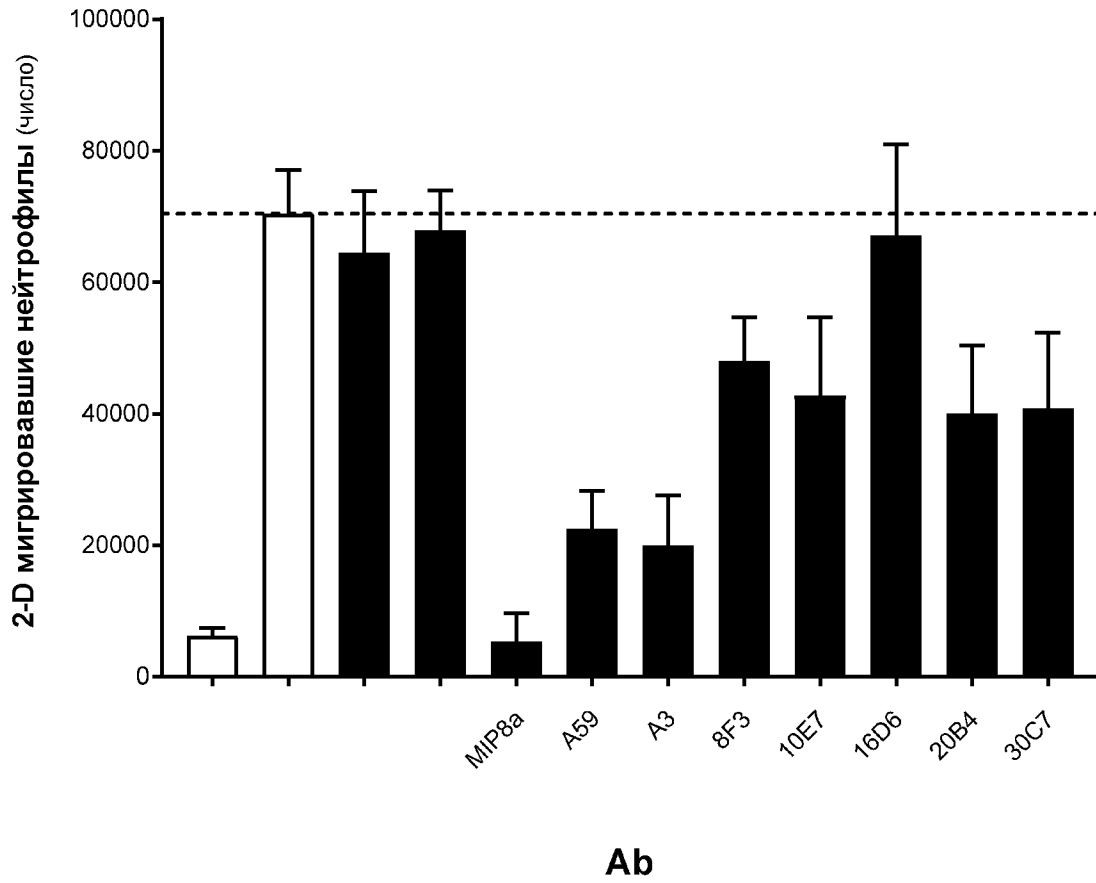
Фигура 19 (Донор 3)



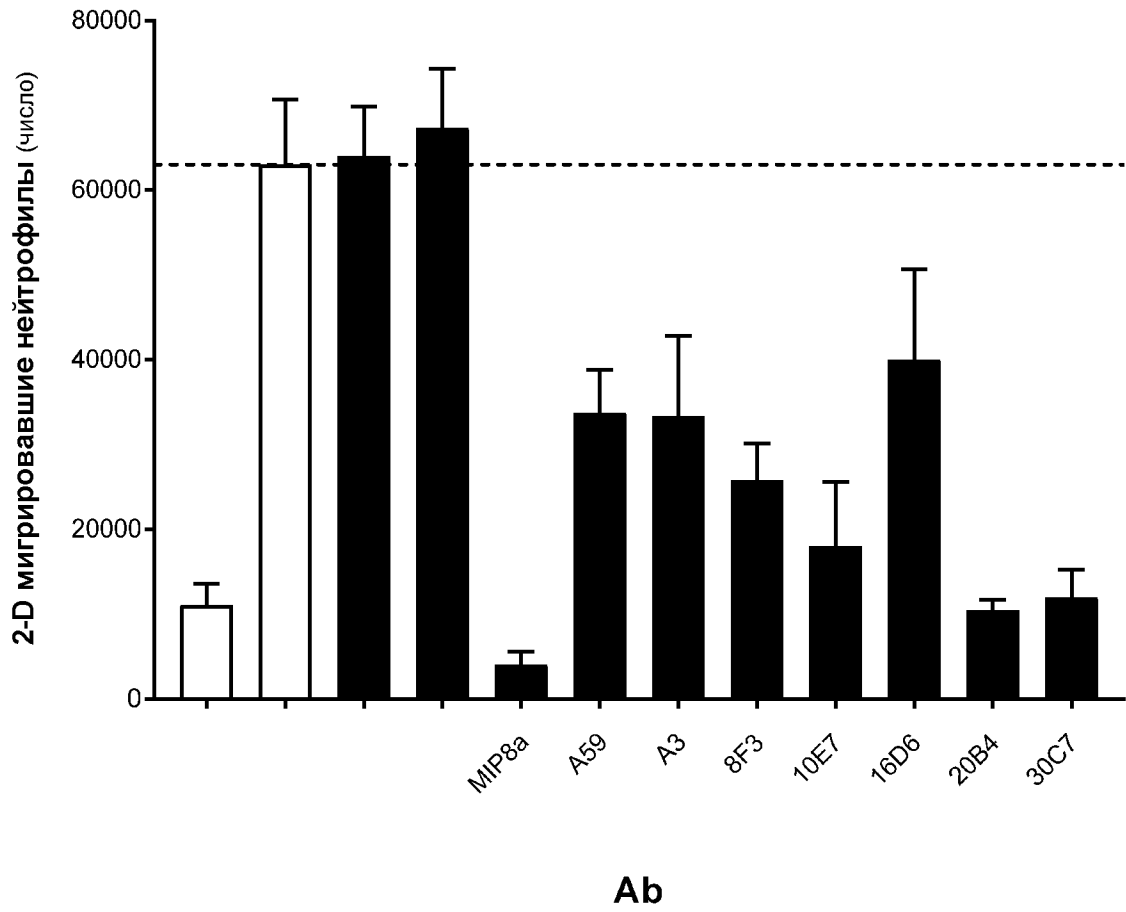
Фигура 20А (Донор 1)



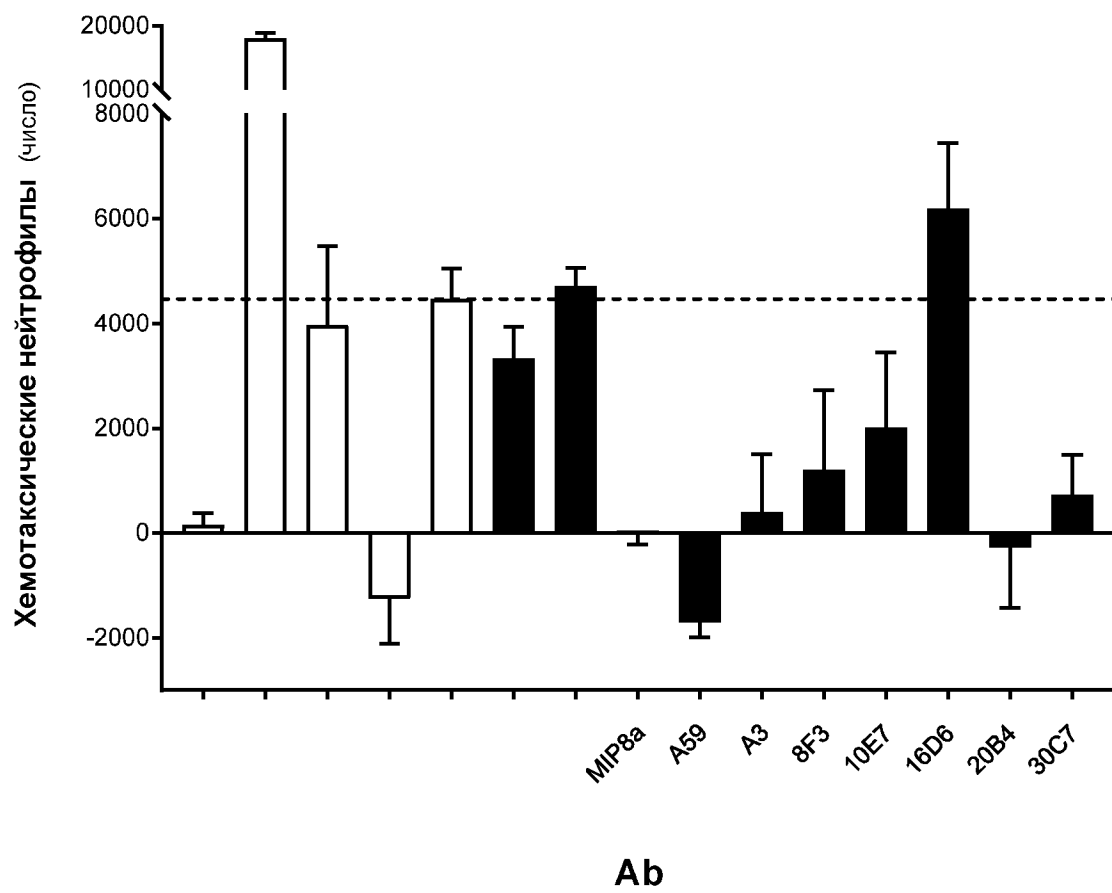
Фигура 20А (Донор 2)



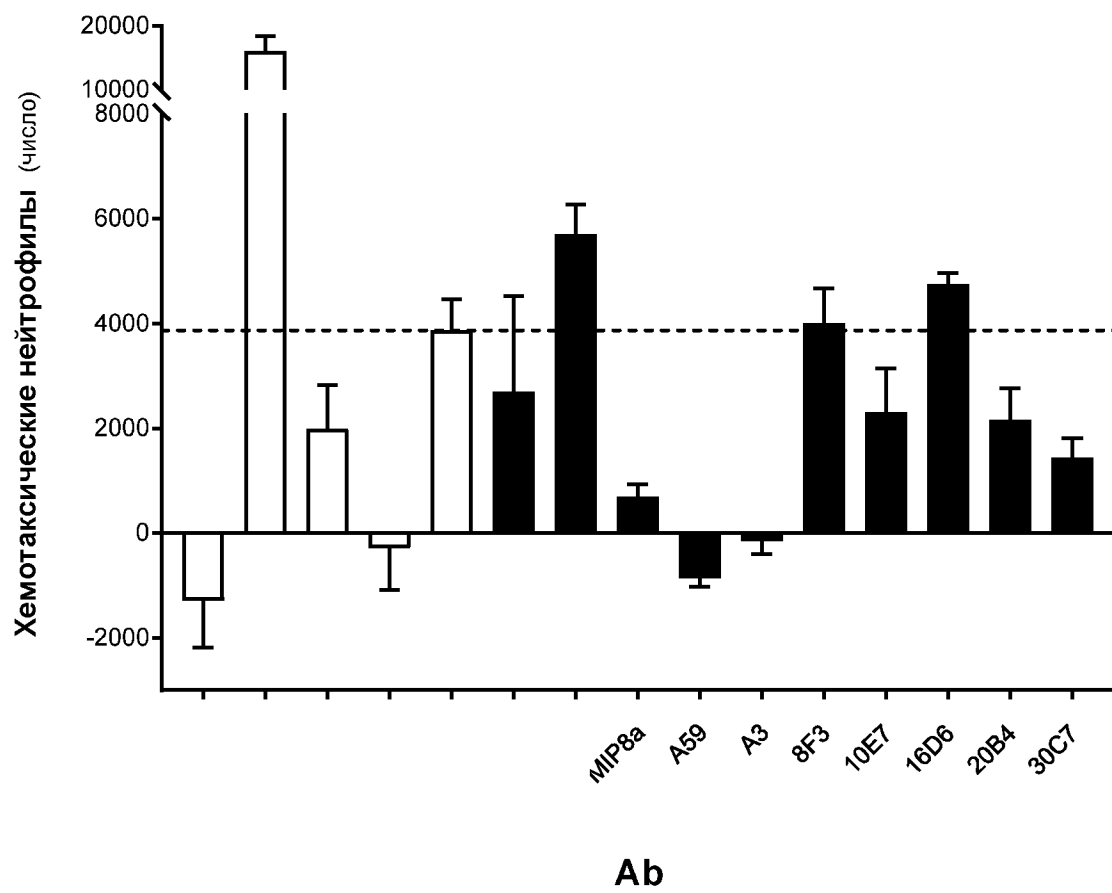
Фигура 20А (Донор 3)



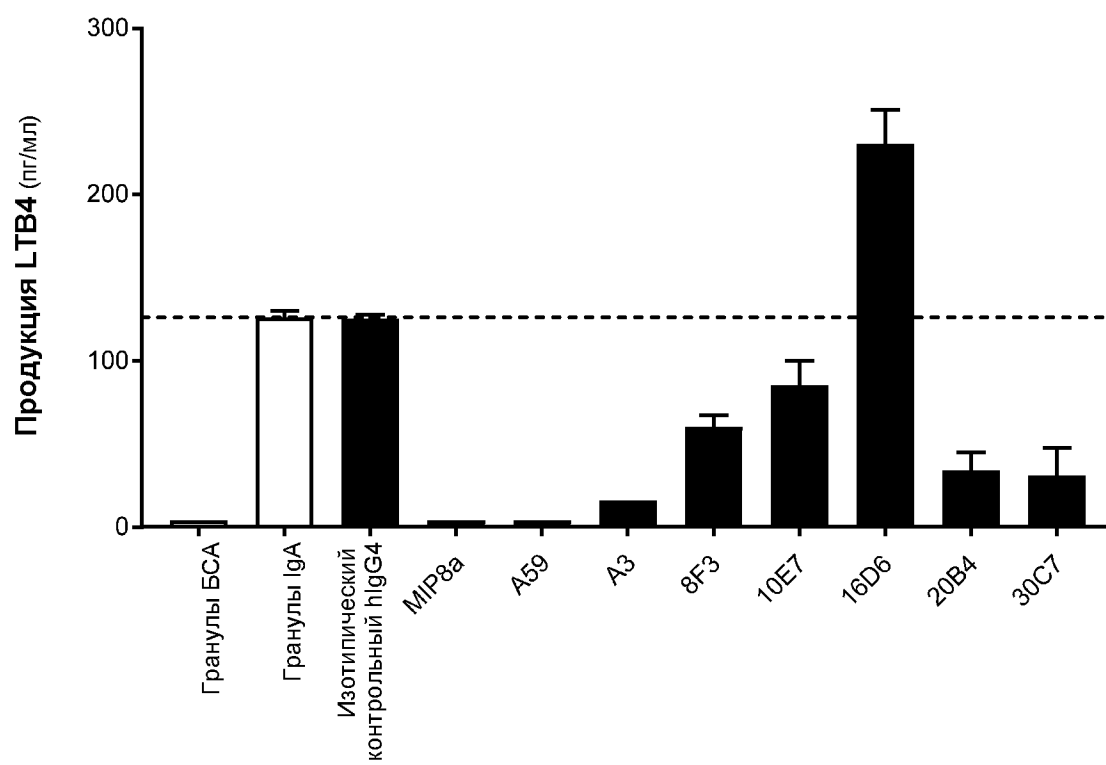
Фигура 20В (Донор 1)



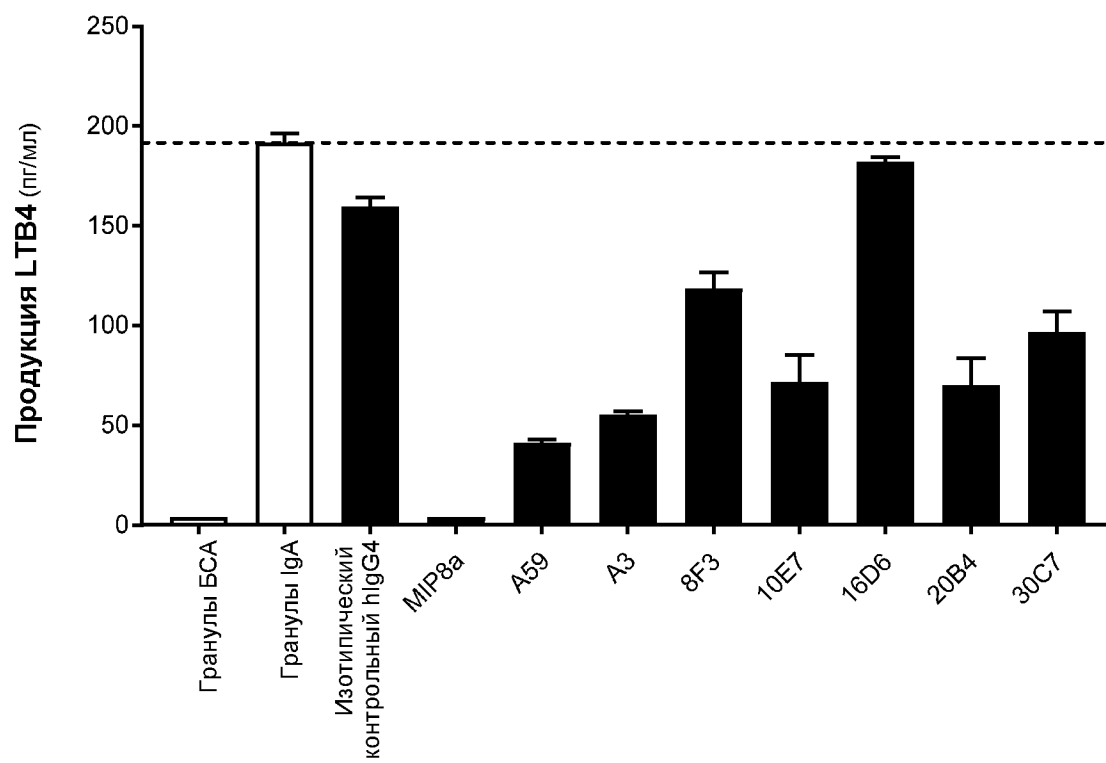
Фигура 20В (Донор 2)



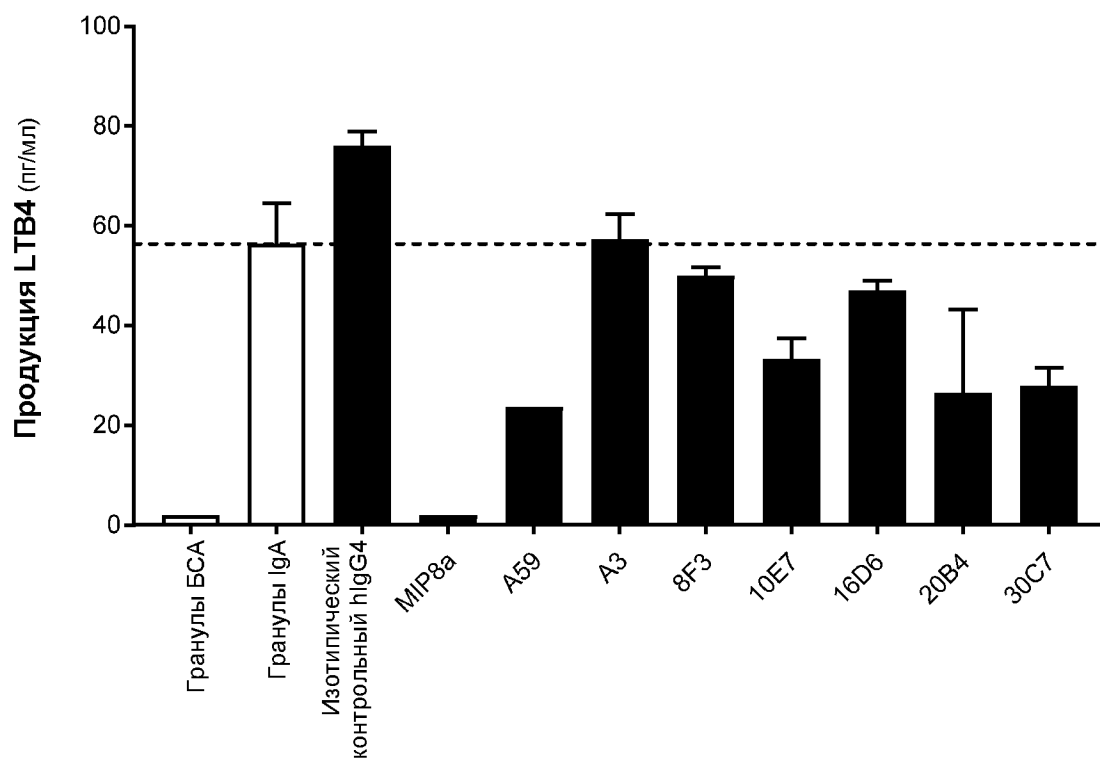
Фигура 20С (Донор 1)



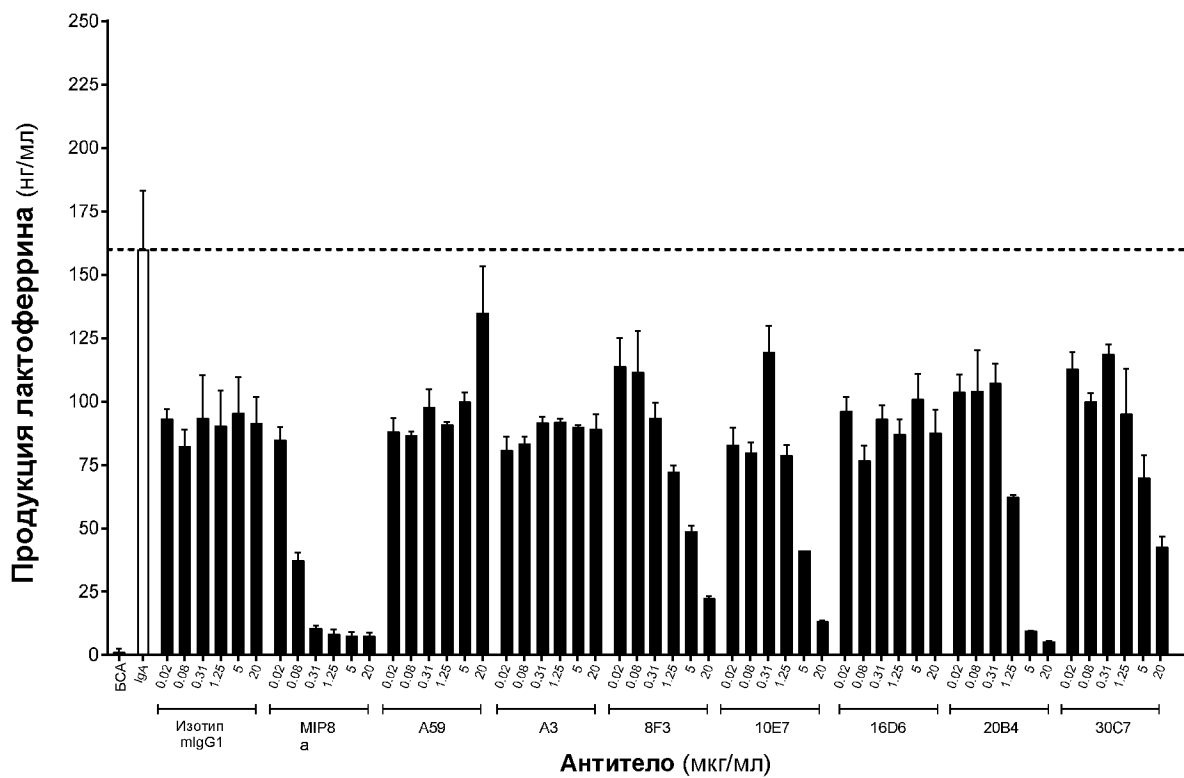
Фигура 20С (Донор 2)



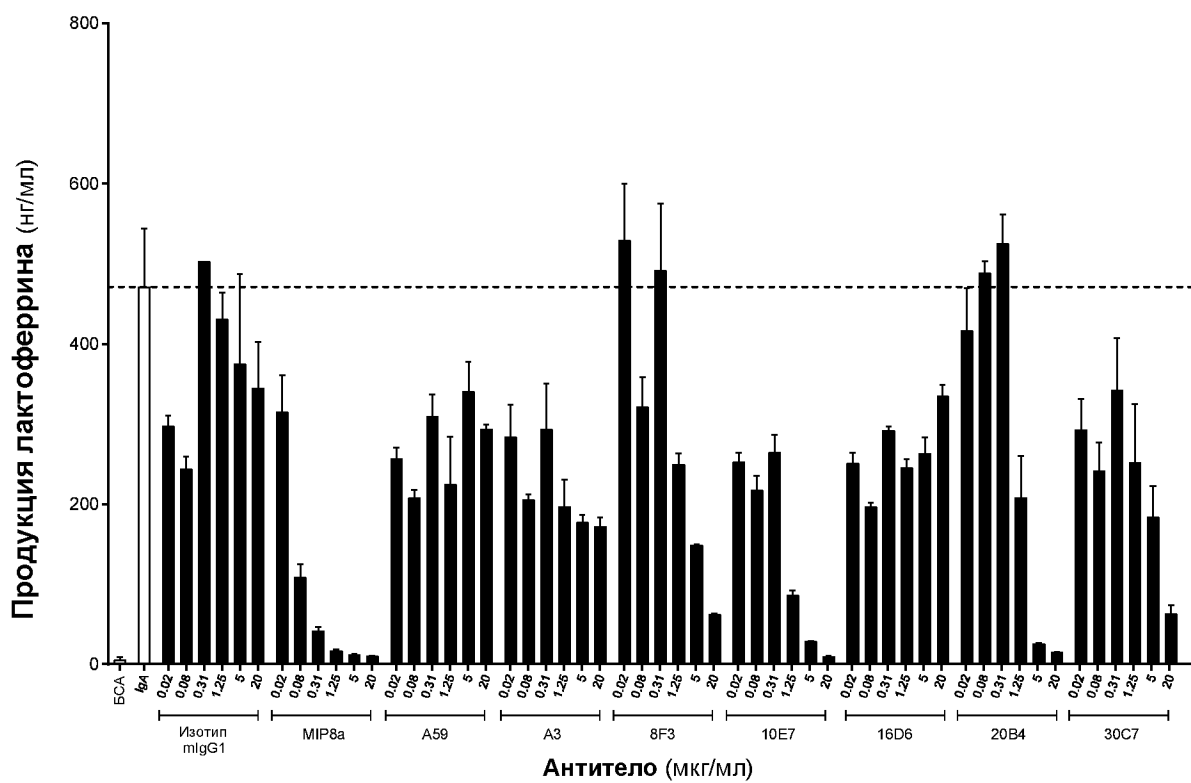
Фигура 20С (Донор 3)



Фигура 21 (Донор 1)



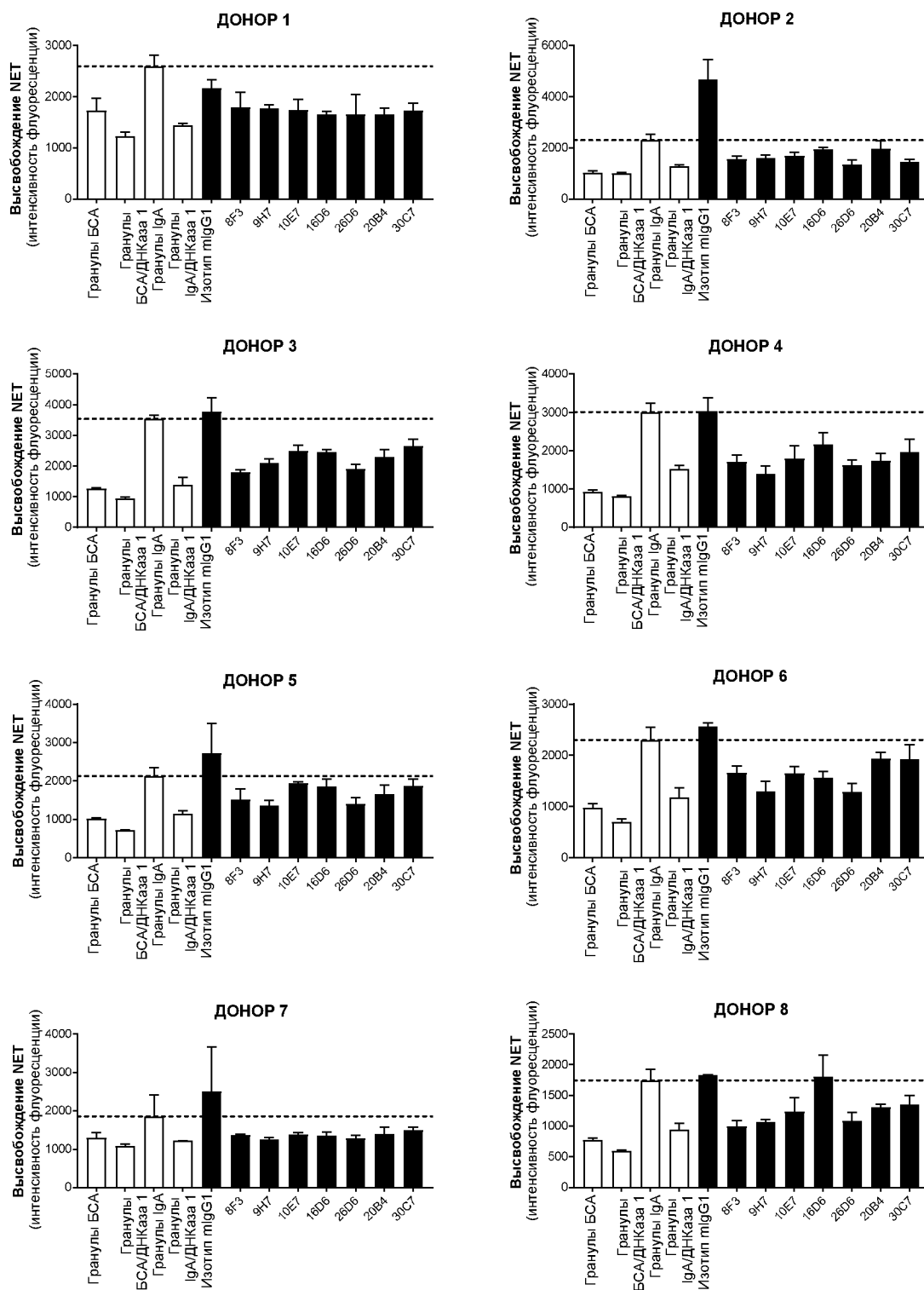
Фигура 21 (Донор 2)



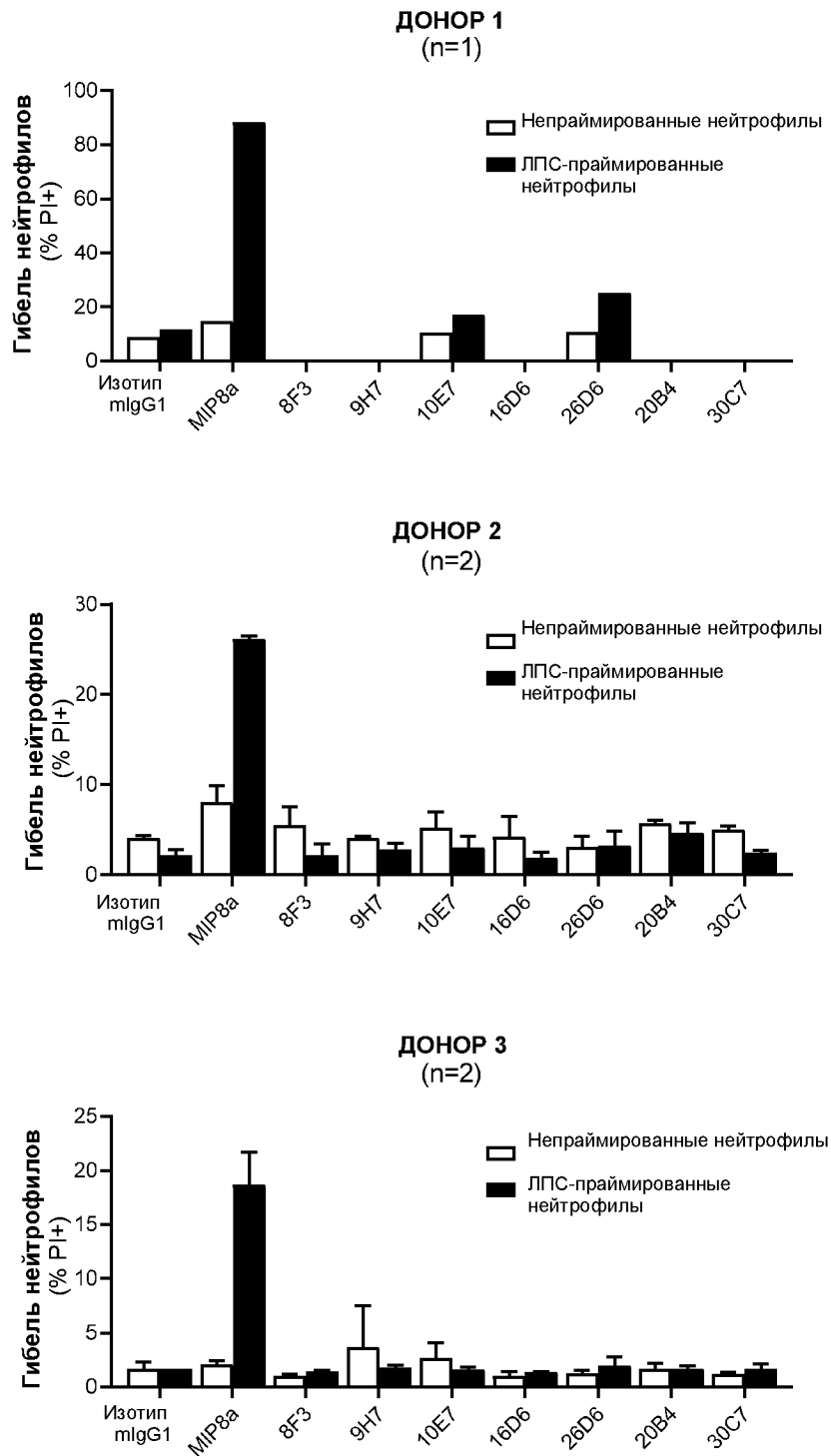
Фигура 22А (депозит клеток, экспрессирующих CD89 человека, согласно Будапештскому договору)

Фигура 22В (депозит клеток, экспрессирующих CD89 человека, согласно Будапештскому договору)

Фигура 23

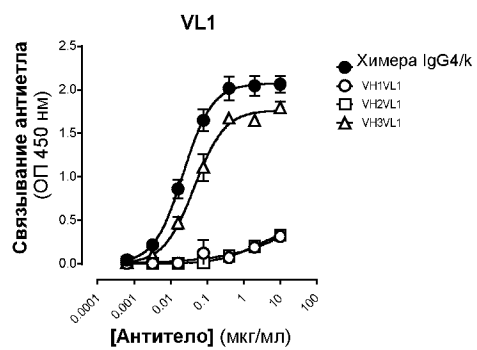


Фигура 24

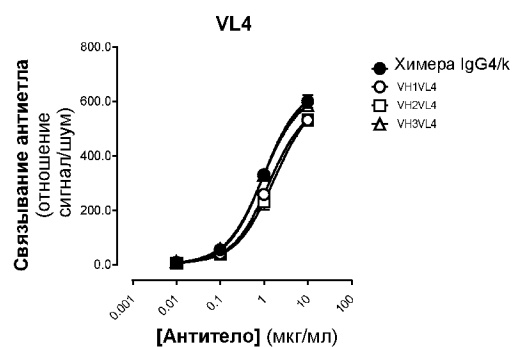
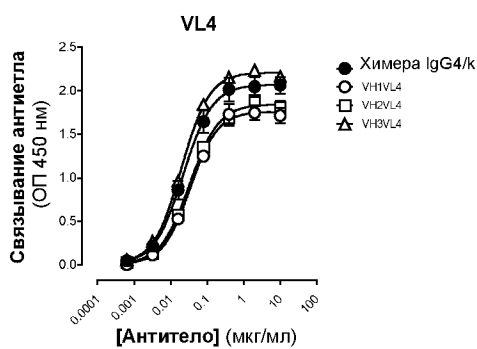
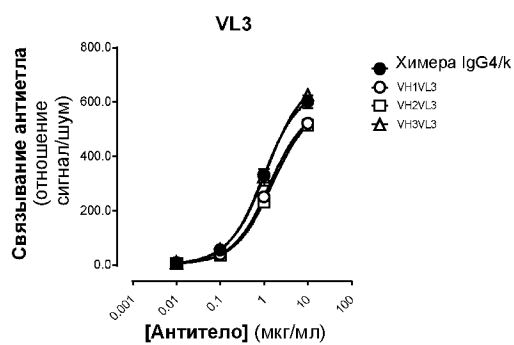
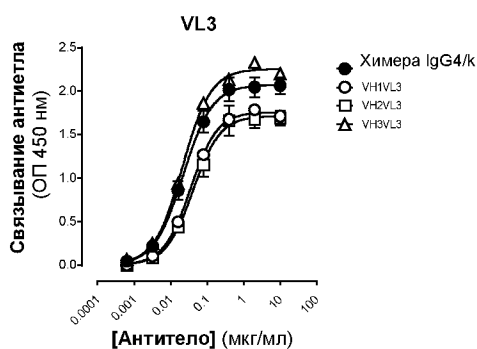
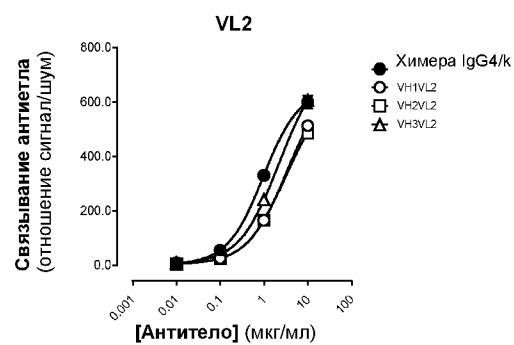
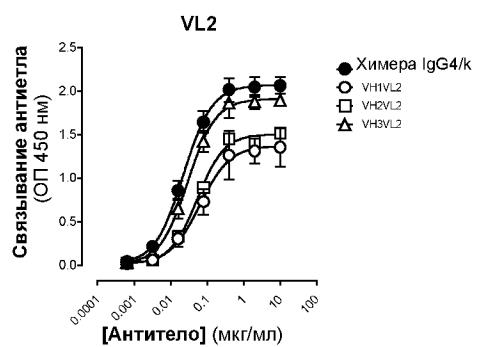
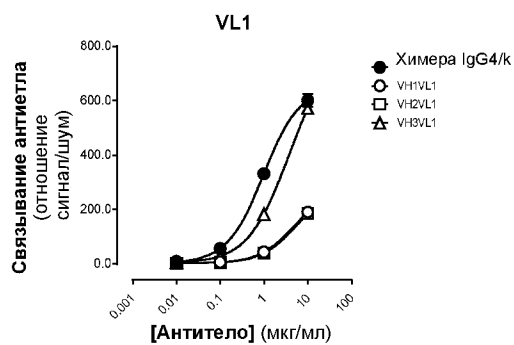


Фигура 25

А

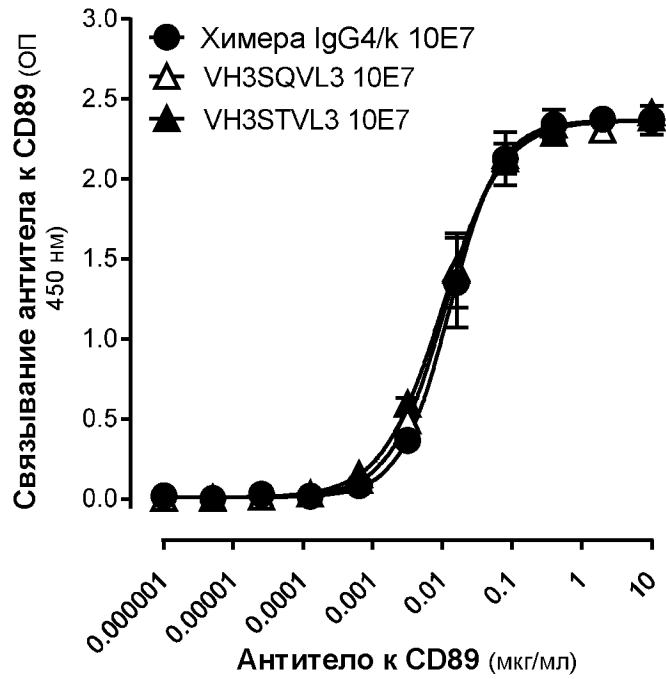


В

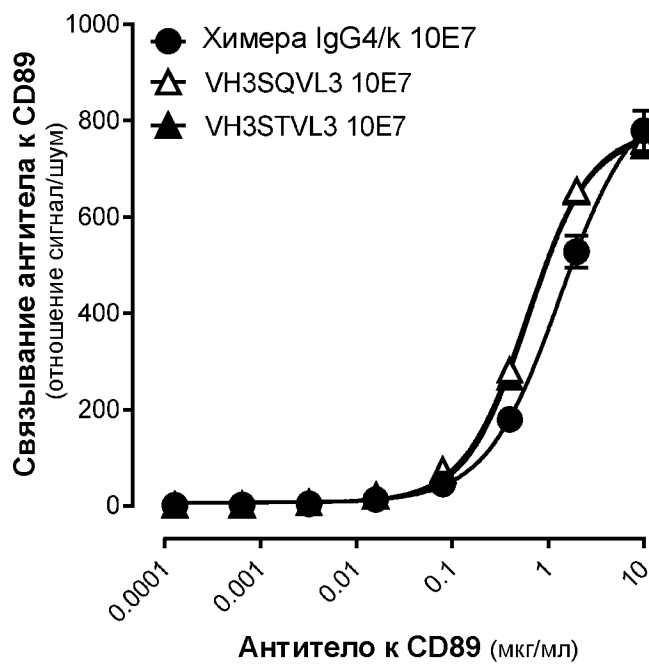


Фигура 26

А

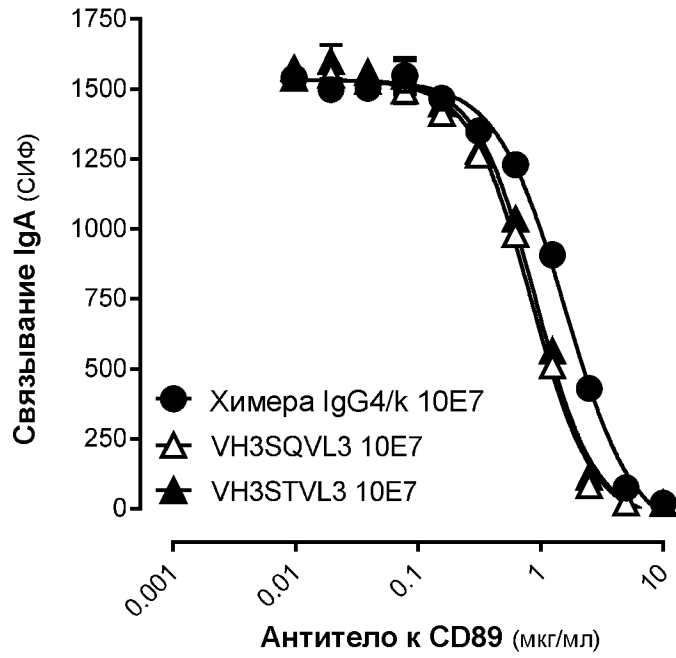


В

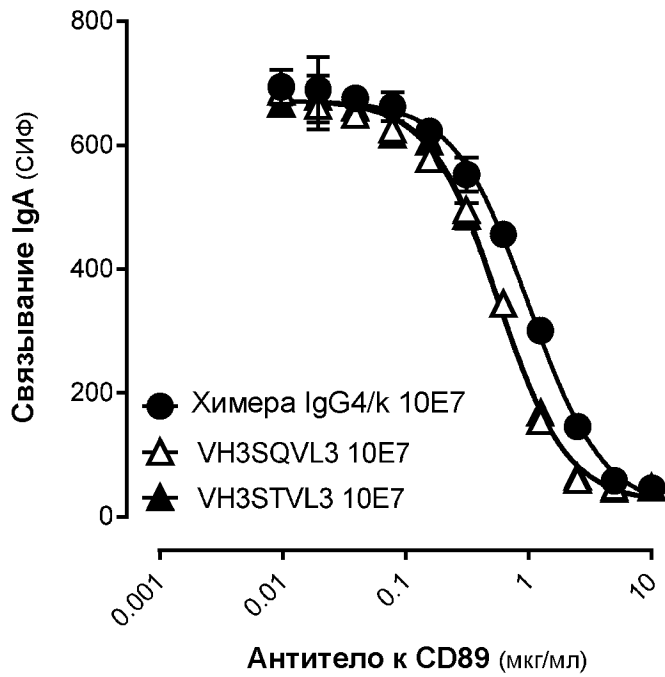


Фигура 27

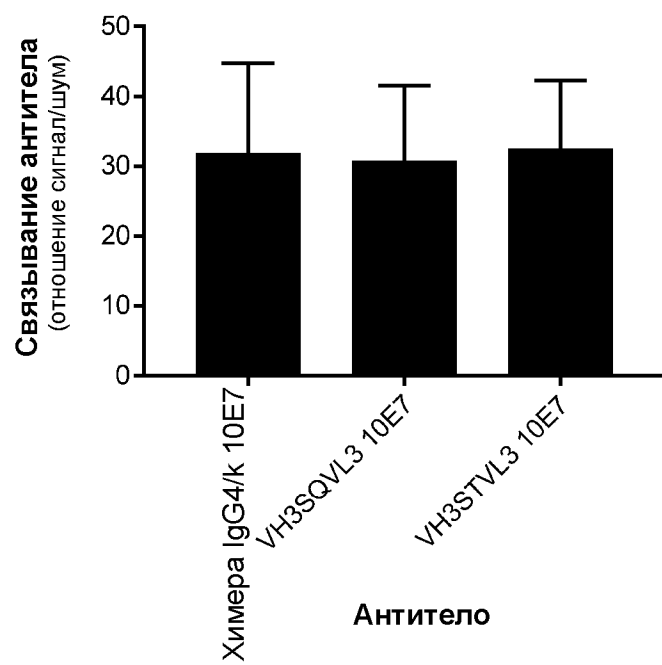
А



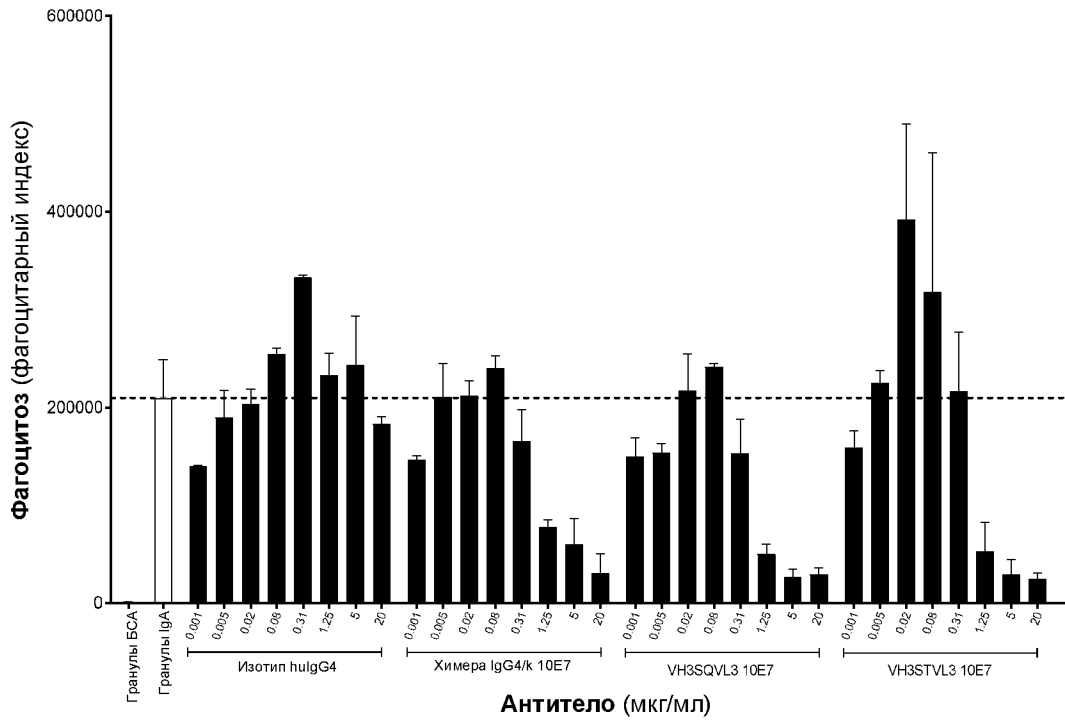
В



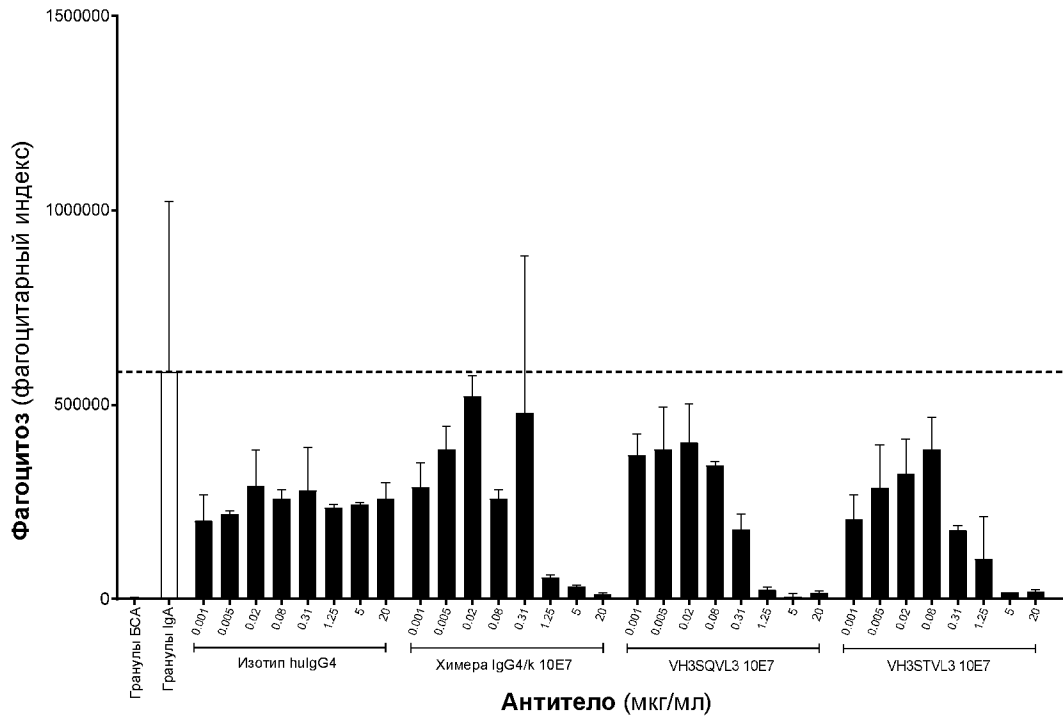
Фигура 28



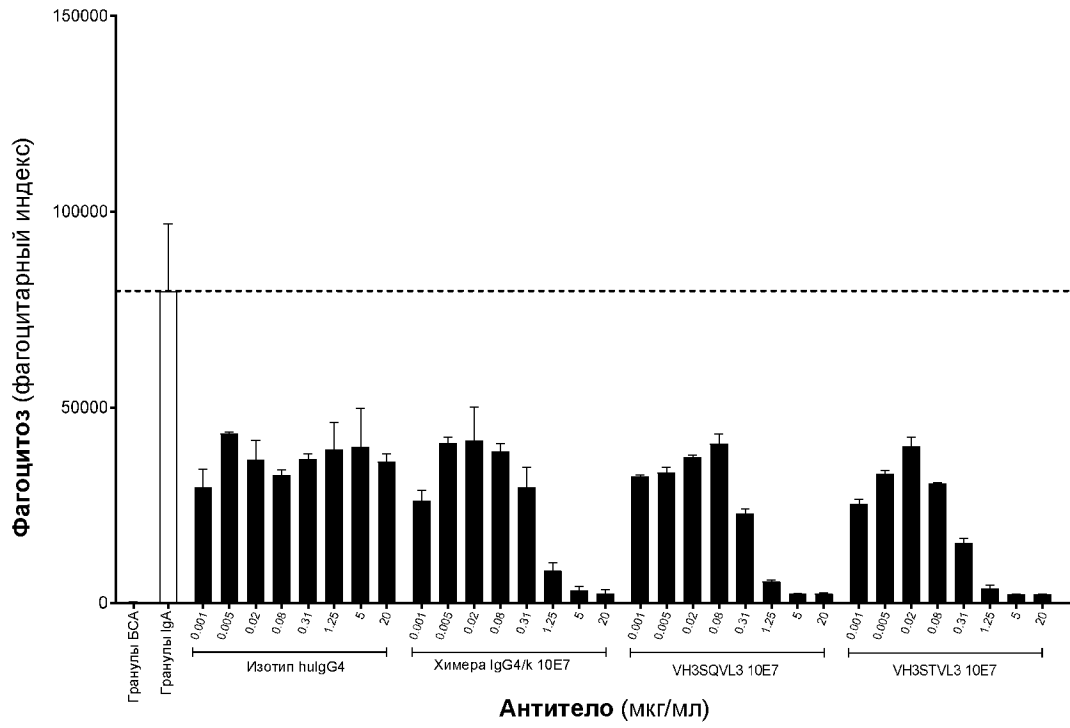
Фигура 29 (Донор 1)



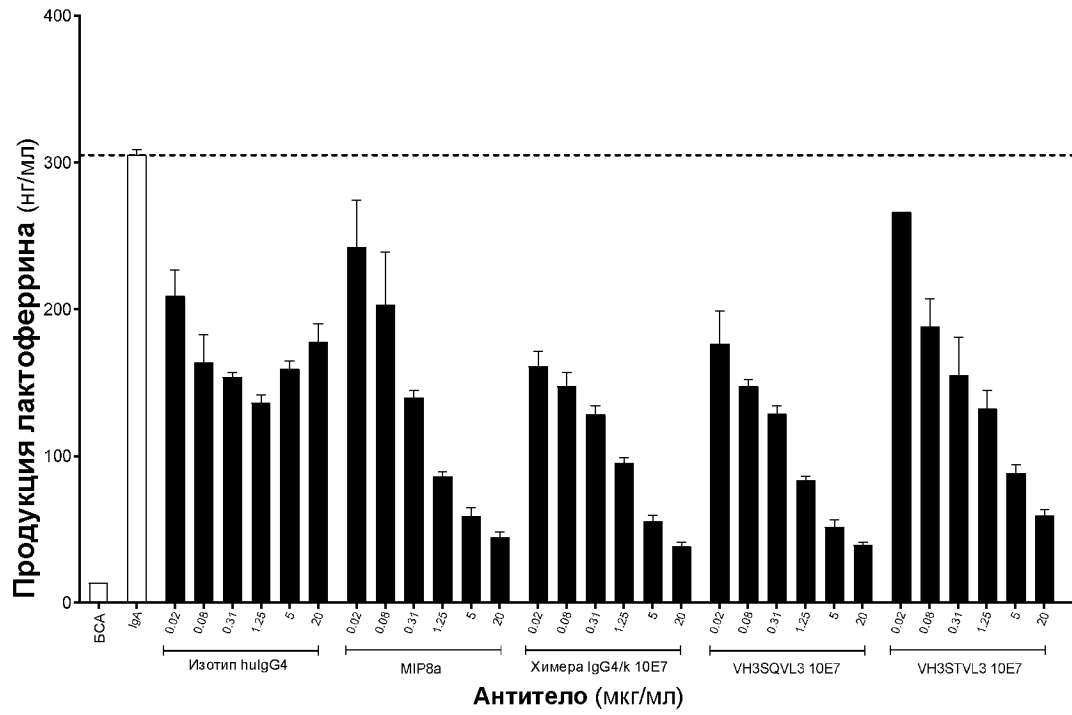
Фигура 29 (Донор 2)



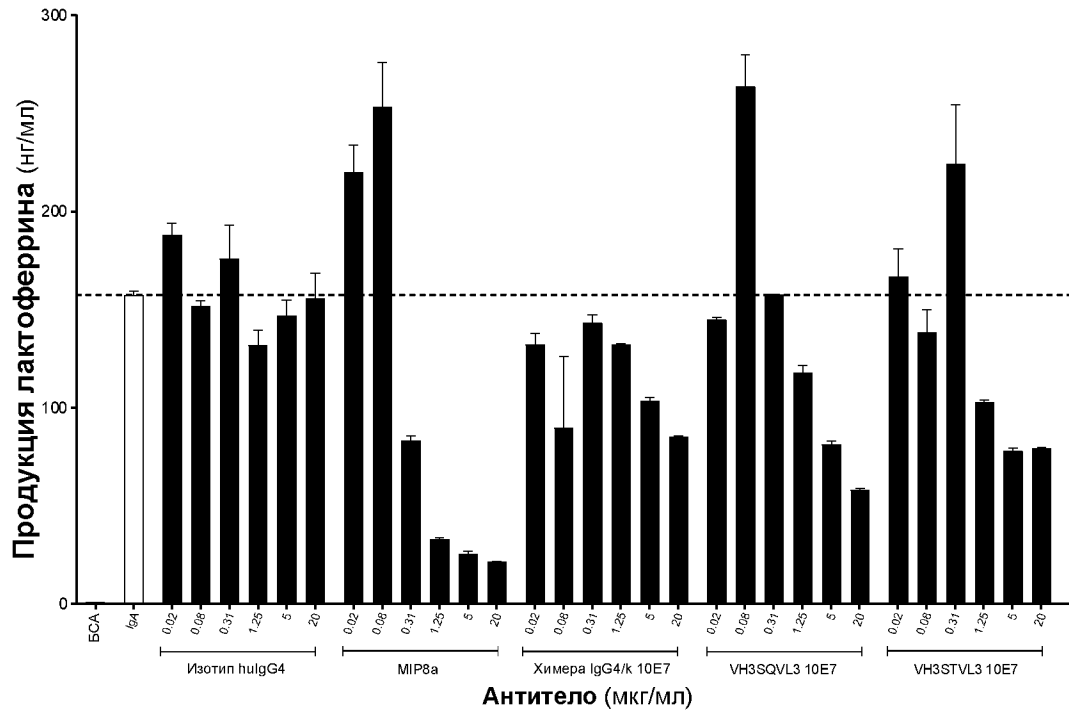
Фигура 29 (Донор 3)



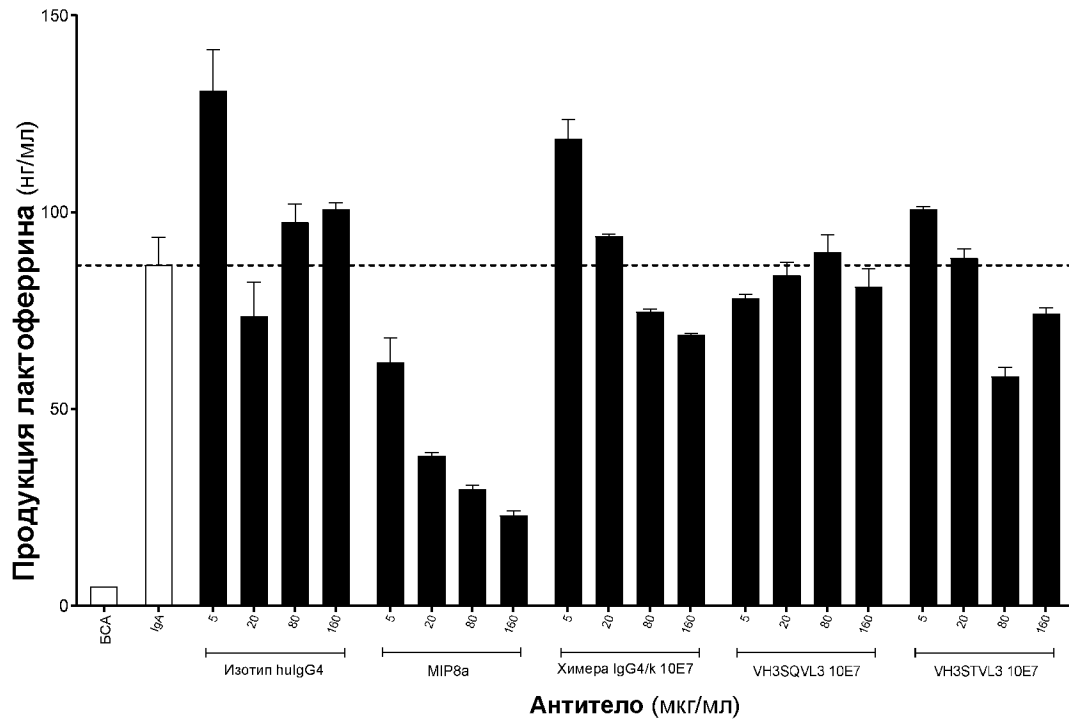
Фигура 30 (Донор 1)



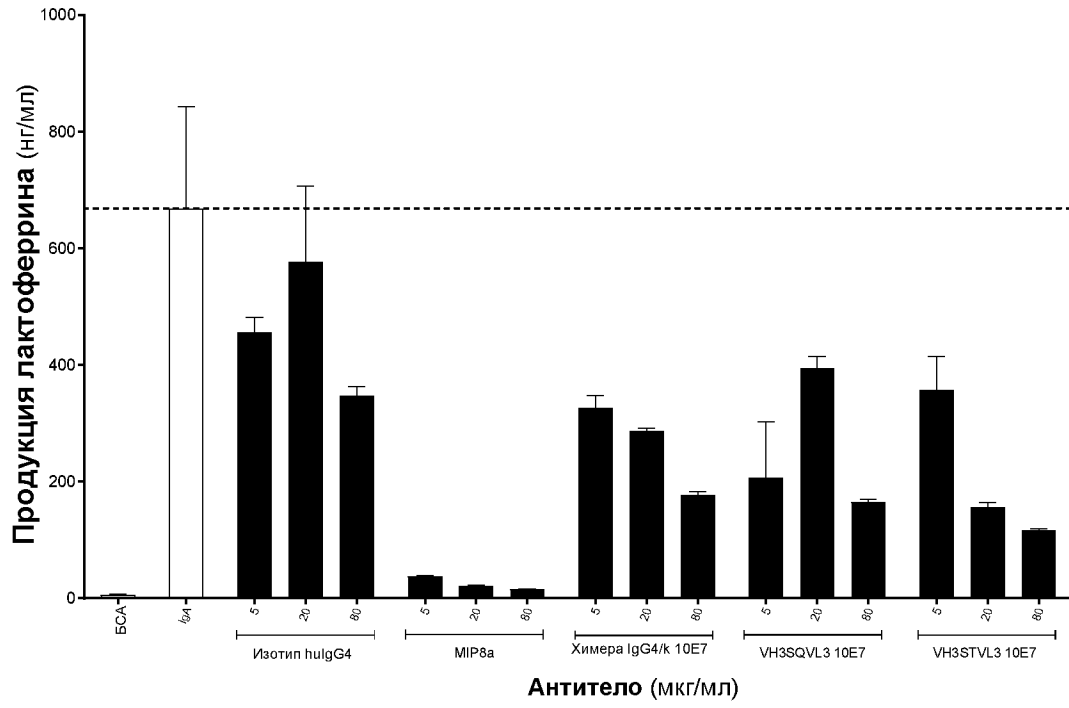
Фигура 30 (Донор 2)



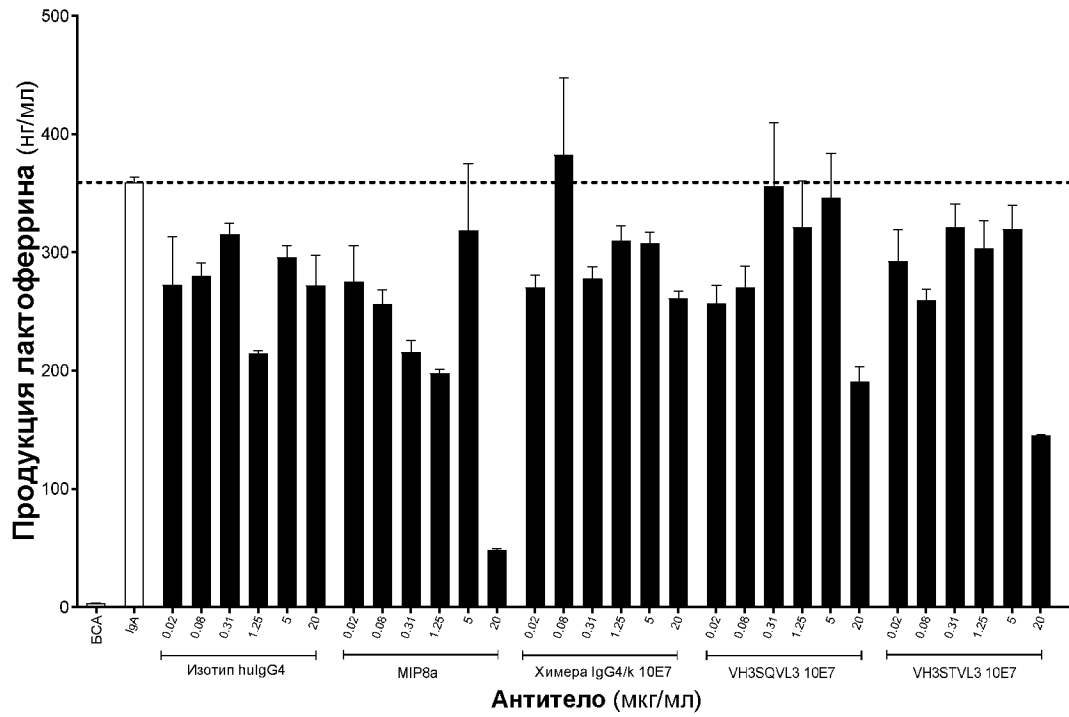
Фигура 30 (Донор 3)



Фигура 30 (Донор 4)

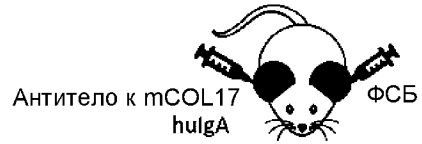


Фигура 30 (Донор 5)



Фигура 31А

Мышь Tg huCD89/hulgA



День	0	2	4	6	7	8	10	11	12	14
ФСБ или анти-mCOL17 hulgA п/к	+	+	+	+		+	+		+	
Изотип mIgG1 или антитело к CD89 10E7 в/б						+			+	

Фигура 31В

