

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390015** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.05

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

(22) Дата подачи заявки
2021.06.11

(54) ДОЗИРОВАНИЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ПОЛИОМАВИРУС АНТИТЕЛ

(31) **63/038,433**

(32) **2020.06.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/036923**

(87) **WO 2021/252835 2021.12.16**

(71) Заявитель:
**ВЕРА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US);
НОВАРТИС АГ (CH)**

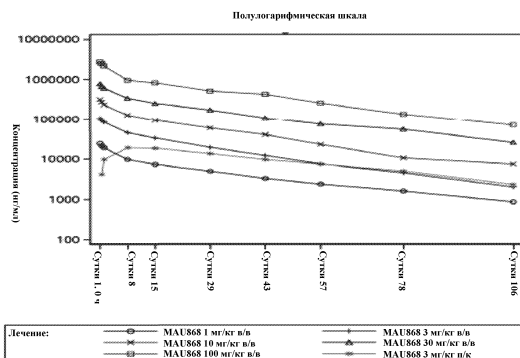
(72) Изобретатель:

**Абенд Йоханна Р., Кнапп Марк,
Ковакс Стивен Дж., Патик Эми К.
(US), Траджиян Элизабетта (CH)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложены режимы введения нейтрализующих полиомавирус антител и связанные с ними способы и фармацевтические композиции для лечения полиомавирусных инфекций.



A1

202390015

202390015

A1

ДОЗИРОВАНИЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ПОЛИОМАВИРУС АНТИТЕЛ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/038433, поданной 12 июня 2020 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

КОММЕНТАРИЙ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, приложенный к настоящей заявке, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включен в настоящее описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, имеет название AMPX_003_01WO_ST25.txt. Данный текстовый файл имеет размер примерно 24 кБ, был создан 4 июня 2021 года и приведен в электронный вид с помощью электронной системы подачи документов EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники

Настоящее изобретение относится к режимам дозирования нейтрализующих полиомавирус антител и связанным с ними способам и фармацевтическим композициям для лечения полиомавирусных инфекций.

Описание соответствующего уровня техники

Полиомавирусы, такие как вирус ВК и вирус JC (Джона Каннингема), являются повсеместно распространенными, при этом уровень их распространения в мире составляет примерно 75-90%. После первичного заражения данные вирусы остаются в скрытой форме у большинства людей, но может происходить реактивация у пациентов с иммунной недостаточностью, включая пациентов, перенесших трансплантацию, которые находятся в состоянии иммунной недостаточности вследствие применения иммуносупрессивной терапии для предупреждения отторжения трансплантата.

Например, у реципиентов трансплантата почки реактивация вируса ВК может приводить к виремии ВК, которая способна вызывать ассоциированную с ВКV нефропатию – основную причину необратимого повреждения почек и недостаточности функции трансплантата. Современный стандарт лечения заключается в уменьшении иммуносупрессии, что влечет за собой значительный риск отторжения трансплантированного органа при активации иммунной системы. Кроме того,

реактивация вируса ВК у реципиентов трансплантата гемопоэтических клеток (НСТ) может вызывать ассоциированный с ВКВ геморрагический цистит, чрезвычайно болезненное состояние, которое может продолжаться от недель до месяцев и приводить к длительным госпитализациям. Современное лечение геморрагического цистита является, как правило, поддерживающим и включает наркотические анальгетики, гидратацию и диурез. Многим пациентам также требуются промывание мочевого пузыря, удаление сгустков, переливание крови, стентирование и нефростомия. В настоящее время одобренных способов лечения вирусных инфекций ВК не существует.

MAU868 представляет собой человеческое моноклональное антитело (иммуноглобулин G, подкласс IgG1/изотип λ), которое эффективно нейтрализует все четыре серотипа ВКВ (см., например, в WO 2017/046676 под названием P8D11). Это антитело распознает конформационный эпитоп на капсидном белке вируса (VP1), ответственном за связывание и облегчение инфицирования новых клеток-мишеней. MAU868 также обладает нейтрализующей активностью против близкородственного вируса JC, который является причиной прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии. Это нейтрализующее антитело может сводить к минимуму осложнения у пациентов, перенесших трансплантацию почки, путем предотвращения наиболее распространенной причины потери аллотрансплантата вследствие вирусной инфекции, и также значительно упрощать схему иммуносупрессивной терапии, с которой сталкиваются клиницисты в настоящее время. Аналогичным образом, лечение или предупреждение ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита у реципиентов НСТ может устранять или уменьшать осложнение, сопровождающееся значительной заболеваемостью и смертностью и острой реакцией «трансплантат против хозяина».

Однако в данной области техники существует потребность в оптимизации дозирования нейтрализующих полиомавирусы антител.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Воплощения настоящего изобретения включают режим дозирования для лечения полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий

(а) парентеральное введение указанному субъекту дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса;

(б) определение в сыворотке или ткани субъекта концентрации указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(в) введение дополнительной дозы указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до того, как минимальная концентрация в сыворотке или ткани (C_{trough}) снизится до менее чем примерно 3-860 мкг/мл;

где указанный режим дозирования обеспечивает поддержание в сыворотке или ткани концентрации указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента выше C_{trough} в течение всего периода лечения.

В некоторых воплощениях:

(1) C_{trough} на стадии (в) соответствует значению в плазме, и режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в плазме снизится до менее чем примерно 150-860 мкг/мл;

(2) C_{trough} на стадии (в) соответствует значению в почечной ткани, и режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в почечной ткани снизится до менее чем примерно 23,5-120 мкг/мл; или

(3) C_{trough} на стадии (в) соответствует значению в ткани мочевого пузыря, и режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в ткани мочевого пузыря снизится до менее чем примерно 3-10 мкг/мл.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) $V_H\text{CDR1}$, $V_H\text{CDR2}$ и $V_H\text{CDR3}$, представленные в SEQ ID NO: 6-8, соответственно; и

вариабельную область легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности $V_L\text{CDR1}$, $V_L\text{CDR2}$ и $V_L\text{CDR3}$, представленные в SEQ ID NO: 9-11, соответственно,

и их варианты, которые специфично связываются с белком VP1.

В некоторых воплощениях:

область V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 12, где, возможно, последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях, возможно выбранных из одного или более из V5Q, G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q; и

область V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 13, где, возможно, последовательность

V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях.

В некоторых воплощениях область V_H содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 12, и область V_L содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 13.

В некоторых воплощениях режим дозирования включает идентификацию генотипа вируса ВК или вируса JC у субъекта. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный из одного или более из генотипов I, II, III и IV, или полиомавирусная инфекция включает вирус JC.

В некоторых воплощениях субъект находится в состоянии иммунной недостаточности. В некоторых воплощениях субъект близок к тому, чтобы быть подвергнутым, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, возможно, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток. В некоторых воплощениях процедура трансплантации выбрана из трансплантации почки и трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ). В некоторых воплощениях субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии.

В некоторых воплощениях доза на стадии (а) составляет от примерно 1 до примерно 100 мг/кг, или примерно 10-30 мг/кг, или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг, где, возможно, указанную дозу вводят внутривенно или подкожно. В некоторых воплощениях дополнительная доза на стадии (в) является такой же, как и доза на стадии (а), или отлична от нее и возможно составляет от примерно 1 до примерно 100 мг/кг, или примерно 10-30 мг/кг, или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг, где, возможно, указанную дозу вводят внутривенно или подкожно.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа I, где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 2618 до примерно 3775 до примерно 13061 раза превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 500 до примерно 692 до

примерно 1000 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,009 \pm 0,010$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа II, где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 589 до примерно 849 до примерно 2942 раз (например, в примерно 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 100 до примерно 156 до примерно 200 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,040 \pm 0,025$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа III, где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 253 до примерно 365 до примерно 1265 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 50 до примерно 67 до примерно 100 раз (например, в примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,

где EC_{50} составляет примерно $0,093 \pm 0,057$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа IV, где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 1122 до примерно 1618 до примерно 5604 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 100 до примерно 297 до примерно 500 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,021 \pm 0,020$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус JC, и концентрация в ткани при C_{trough} представляет собой значения, которые в по меньшей мере от примерно 29 до примерно 110 до примерно 158 до примерно 547 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,215 \pm 0,130$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях промежуток времени между стадиями (а) и (б) составляет примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или 1, 2 или 3 месяца. Некоторые режимы дозирования включают (б) определение содержания в сыворотке или ткани субъекта примерно один раз каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или примерно 1-3 раза каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или примерно 1-6 раз каждые 1, 2 или 3 месяца. В некоторых воплощениях промежуток времени между стадиями (а) и (в) составляет примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или 1, 2 или 3 месяца. В некоторых воплощениях по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% или более от концентрации циркулирующего в сыворотке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента проникает в инфицированный орган. В некоторых воплощениях инфицированный орган представляет собой мочевой пузырь или почку, или центральную нервную систему (ЦНС).

В некоторых воплощениях среднее значение клиренса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 0,0760-0,0996 мл/сутки/кг. В некоторых воплощениях средний объем распределения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 49,8-81,9 мл/кг.

Также включены способы лечения полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие парентеральное введение указанному субъекту дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса, где доза составляет примерно 10-30 мг/кг, или примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

содержат

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) V_HCDR1 , V_HCDR2 и V_HCDR3 , представленные в SEQ ID NO: 6-8, соответственно; и

вариабельную область легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности V_LCDR1 , V_LCDR2 и V_LCDR3 , представленные в SEQ ID NO: 9-11, соответственно, и их варианты, которые специфично связываются с белком VP1.

В некоторых воплощениях:

область V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 12, где, возможно, последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях, возможно выбранных из одного или более из V5Q, G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q; и

область V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 13, где, возможно, последовательность V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях.

В некоторых воплощениях область V_H содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 12, и область V_L содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 13.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный из одного или более из генотипов I, II, III и IV. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус JC.

В некоторых воплощениях субъект находится в состоянии иммунной недостаточности. В некоторых воплощениях субъект близок к тому, чтобы быть подвергнутым, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, возможно, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток. В некоторых воплощениях процедура трансплантации выбрана из трансплантации почки и трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ). В некоторых воплощениях субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии.

В некоторых воплощениях по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% или более от концентрации циркулирующего в сыворотке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента проникает в инфицированный орган.

В некоторых воплощениях инфицированный орган представляет собой мочевой пузырь или почку. В некоторых воплощениях среднее значение клиренса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 0,0760-0,0996 мл/сутки/кг. В некоторых воплощениях средний объем распределения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 49,8-81,9 мл/кг. В некоторых воплощениях доза 10-30 мг/кг обеспечивает оптимальную нейтрализующую активность (IC_{50}) в сыворотке субъекта в отношении полиомавируса ВК или JC, определяемую в анализе содержания вируса *in vitro* или *ex vivo*.

В некоторых воплощениях указанные режим дозирования или способ лечения обеспечивают уменьшение виремии и/или вирурии ВК или JC у субъекта, возможно на примерно или по меньшей мере примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000% или 5000% или более, по сравнению с контролем или состоянием до лечения с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых воплощениях указанные режим дозирования или способ лечения обеспечивают уменьшение или облегчение у субъекта одного или более симптомов, ассоциированных с вирусом ВК или JC, возможно одного или более симптомов, выбранных из нарушения четкости зрения или других изменений зрения, мочи коричневого или красного цвета, боли при мочеиспускании, снижения функции почек, затрудненного мочеиспускания, кашля, простуды, затрудненного дыхания, лихорадки, мышечной боли, мышечной слабости и/или судорог, возможно сужения мочеточников или воспаления почек, такого как интерстициальный нефрит. В некоторых воплощениях указанные режим дозирования или способ лечения включают введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции, которая содержит гистидин, сахарид, возможно сахарозу, и полиол, возможно полисорбат.

Также включены фармацевтические композиции, содержащие:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, приготовленные в виде состава для парентерального введения в дозе примерно 10-30 мг/кг и содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) V_HCDR1 , V_HCDR2 и V_HCDR3 , представленные в SEQ ID NO: 6-8, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности V_LCDR1 , V_LCDR2 и V_LCDR3 , представленные в SEQ ID NO: 9-11, соответственно; и

фармацевтически приемлемый носитель, содержащий гистидин, сахарид, возможно сахарозу, и полиол, возможно полисорбат.

В некоторых воплощениях область V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 12, где, возможно, последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях, возможно выбранных из одного или более из V5Q, G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q; и

область V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 13, где, возможно, последовательность V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент приготовлены в виде состава для парентерального введения в дозе примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг. Некоторые композиции приготовлены в виде состава для внутривенного введения. Некоторые композиции приготовлены в виде состава для подкожного введения.

Некоторые воплощения включают фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, для применения при лечении полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный из одного или более из генотипов I, II, III и IV. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус JC. В некоторых воплощениях субъект находится в состоянии иммунной недостаточности. В некоторых воплощениях субъект близок к тому, чтобы быть подвергнутым, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, возможно, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток. В некоторых воплощениях процедура трансплантации выбрана из трансплантации почки и трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ). В некоторых воплощениях субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1** представлена зависимость экспозиции MAU868 от времени после внутривенного или подкожного введения.

На **фигуре 2** представлена нейтрализующая активность *ex vivo* для MAU868 из

сыворотки пациента относительно его концентрации в сыворотке. $BKVEC_{50}$ = объем сыворотки, необходимый для нейтрализации инфекции *in vitro* на 50%.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют то же самое значение, которое обычно понятно специалистам в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы, материалы, композиции, реагенты, клетки, сходные с описанными в настоящем документе или эквивалентные таковым, могут быть применены на практике или для исследования предмета настоящего изобретения, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации и ссылки, включая, но не ограничиваясь ими, патенты и патентные заявки, указанные в настоящем описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или ссылка были конкретно и отдельно включены в настоящий документ посредством ссылки как изложенные полностью. Любая патентная заявка, на основании которой настоящая заявка испрашивает приоритет, также полностью включена в настоящий документ посредством ссылки тем же способом, который описан выше для публикаций и ссылок.

Для получения рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей могут быть использованы стандартные методы (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методы очистки могут быть осуществлены в соответствии со спецификациями производителя, либо так, как их обычно выполняют в данной области техники, либо так, как описано в настоящем документе. Эти методы и сходные с ними методы и процедуры могут, как правило, быть осуществлены в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и так, как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые указаны и обсуждаются в тексте настоящего описания. Если не предложены конкретные определения, то номенклатура, используемая в связи с молекулярной биологией, аналитической химией, синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией, и лабораторные процедуры и методы, относящиеся к перечисленным выше областям и описанные в настоящем документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области техники. Стандартные методы могут быть использованы для рекомбинантной технологии, молекулярно-биологических, микробиологических, химических синтезов, химических

анализов, получения фармацевтических препаратов, получения фармацевтических составов и доставки, а также лечения пациентов.

Для целей настоящего изобретения ниже приведены определения следующих терминов.

В настоящем документе неопределенная форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (то есть по меньшей мере одного) определяемого объекта. Например, «элемент» включает «один элемент», «один или более элементов» и/или «по меньшей мере один элемент».

Под «примерно» подразумевается количественная величина, уровень, значение, число, частота, процентная доля, размерная величина, размер, количество, масса или длина, которые изменены на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% по сравнению с эталонными количественной величиной, уровнем, значением, числом, частотой, процентной долей, размерной величиной, размером, количеством, массой или длиной.

Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, которая может быть связана селективным связывающим агентом, таким как антитело, и, кроме того, которую можно применять у животного для получения антител, способных к связыванию с эпитопом этого антигена. Антиген может иметь один или более эпитопов. В настоящем документе термин «антиген» включает вещества, которые способны, при соответствующих условиях, вызывать иммунный ответ на вещество и реагировать с продуктами иммунного ответа. Например, антиген может распознаваться антителами (гуморальный иммунный ответ) или сенсibilизированными Т-лимфоцитами (Т-хелперный или клеточно-опосредованный иммунный ответ), или и теми, и другими. Антигены могут представлять собой растворимые вещества, такие как токсины и чужеродные белки, или частицы, такие как бактерии и клетки ткани; однако только часть молекулы белка или полисахарида, известная как антигенная детерминанта (эпитопы), связывается с антителом или специфическим рецептором на лимфоците. В более широком смысле термин «антиген» включает любое вещество, с которым связывается антитело или для которого желательно получение антител независимо от того, является ли это вещество иммуногенным. Для таких антигенов антитела могут быть идентифицированы рекомбинантными методами независимо от какого-либо иммунного ответа.

«Антагонист» относится к биологической структуре или химическому агенту, который нарушает или иным образом уменьшает физиологическое действие другого

агента или молекулы. В некоторых случаях антагонист специфично связывается с другим агентом или молекулой. Включены полные и частичные антагонисты.

«Агонист» относится к биологической структуре или химическому агенту, который увеличивает или усиливает физиологическое действие другого агента или молекулы. В некоторых случаях агонист специфично связывается с другим агентом или молекулой. Включены полные и частичные агонисты.

В настоящем документе термин «аминокислота» предназначен для обозначения как природных, так и неприродных аминокислот, а также аналогов и миметиков аминокислот. Природные аминокислоты включают 20 (L)-аминокислот, используемых во время биосинтеза белка, а также другие аминокислоты, такие как, например, 4-гидроксипролин, гидроксизин, десмозин, изодесмозин, гомоцистеин, цитруллин и орнитин. Неприродные аминокислоты включают, например, (D)-аминокислоты, норлейцин, норвалин, п-фторфенилаланин, этионин и тому подобное, которые известны специалисту в данной области техники. Аналоги аминокислот включают модифицированные формы природных и неприродных аминокислот. Такие модификации могут включать, например, замещение или замену химических групп и фрагментов в молекуле аминокислоты или получение производных аминокислоты. Миметики аминокислот включают, например, органические структуры, которые демонстрируют функционально сходные свойства, такие как заряд и расстояние между зарядами для эталонной аминокислоты. Например, органическая структура, которая является миметиком аргинина (Arg или R), будет содержать положительно заряженный фрагмент, расположенный в сходном молекулярном пространстве и имеющий ту же степень подвижности, что и ϵ -аминогруппа боковой цепи природной аминокислоты Arg. Миметики также включают конформационно ограниченные структуры для поддержания оптимального пространственного расположения и взаимодействий зарядов аминокислоты или функциональных групп аминокислоты. Специалисты в данной области техники знают или могут определить, какие структуры являются основой для функционально эквивалентных аналогов аминокислот и миметиков аминокислот.

В настоящем документе термин «антитело» охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также и их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом с необходимой специфичностью, гуманизированные

антитела, химерные антитела и любую другую молекулу иммуноглобулина с модифицированной конфигурацией, содержащую антигенсвязывающий сайт или фрагмент (сайт распознавания эпитопа) с необходимой специфичностью. Некоторые свойства и характеристики антител (и их антигенсвязывающих фрагментов) описаны более подробно в настоящем документе.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть по существу любого типа. Как хорошо известно в данной области техники, антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную к специфичному связыванию с мишенью, такой как молекула иммунной контрольной точки, через по меньшей мере один сайт распознавания эпитопа, расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту, содержащему по меньшей мере одну CDR тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина, которая связывается с представляющим интерес антигеном. В этом отношении антигенсвязывающий фрагмент антител, описанных в настоящем документе, может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR из последовательностей V_H и V_L из антител, которые связываются с молекулой-мишенью.

Характеристики связывания антител и их антигенсвязывающих фрагментов можно количественно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (см. Davies et al., Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990). В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с молекулой-мишенью, например, белком VP1 или его эпитопом или комплексом, с равновесной константой диссоциации, которая составляет примерно или находится в диапазоне от примерно $\leq 10^{-7}$ М до примерно 10^{-8} М. В некоторых воплощениях равновесная константа диссоциации составляет примерно или находится в диапазоне от примерно $\leq 10^{-9}$ М до примерно $\leq 10^{-10}$ М. В некоторых иллюстративных воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют аффинность (K_d или EC_{50}) в отношении молекулы-мишени (с которой они специфично связываются), составляющую примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50 нМ.

Говорят, что молекула, такая как антитело, демонстрирует «специфичное связывание» или «предпочтительное связывание», если она чаще, быстрее, на более

длительное время и/или с большей аффинностью вступает в реакцию или связывается с конкретной клеткой, веществом или конкретным эпитопом, чем с альтернативными клетками или веществами, или эпитопами. Антитело «специфично связывается» или «предпочтительно связывается» с молекулой-мишенью или эпитопом, если оно с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или на более длительное время связывается с ними, чем с другими веществами или эпитопами, например, в статистически значимом количестве. Как правило, один элемент из пары молекул, демонстрирующий специфичное связывание, содержит на своей поверхности область, или полость, которая специфично связывается с конкретной пространственной и/или полярной структурой другого элемента из пары молекул и, следовательно, комплементарна этой структуре. Таким образом, элементы указанной пары обладают свойством специфично связываться друг с другом. Например, антитело, которое специфично или предпочтительно связывается со специфическим эпитопом, представляет собой антитело, которое с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или на более длительное время связывается с этим специфическим эпитопом, чем с другими эпитопами. Из этого определения также следует, что, например, антитело (или фрагмент, или эпитоп), которое специфично или предпочтительно связывается с первой мишенью, может специфично или предпочтительно связываться или не связываться со второй мишенью. Этот термин также применим, когда, например, антитело является специфичным в отношении конкретного эпитопа, который содержится в ряде антигенов, и в этом случае специфично связывающийся элемент, несущий антигенсвязывающий фрагмент или домен, будет способен связываться с различными антигенами, несущими данный эпитоп; например, указанный элемент может вступать в перекрестную реакцию с рядом различных форм антигена-мишени из нескольких видов, которые содержат общий эпитоп.

Иммунологическое связывание обычно относится к нековалентным взаимодействиям, происходящим между молекулой иммуноглобулина и антигеном, в отношении которого иммуноглобулин является специфичным, например, в качестве иллюстрации, но не ограничения, благодаря наличию электростатического, ионного, гидрофильного и/или гидрофобного притяжения или отталкивания, стерических сил, водородных связей, сил Ван-дер-Ваальса и других взаимодействий. Сила или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий может быть выражена в терминах константы диссоциации (K_d), характеризующей взаимодействие, где меньшее

значение K_d соответствует большей аффинности. Иммунологические характеристики связывания выбранных полипептидов можно количественно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Один из таких способов предусматривает определение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, причем эти скорости зависят от концентраций образующих комплекс партнеров, аффинности взаимодействия и от геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, и «константа скорости прямой реакции» (K_{on}), и «константа скорости обратной реакции» (K_{off}) могут быть определены путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. Отношение K_{off}/K_{on} позволяет исключить все параметры, не связанные с аффинностью, и, таким образом, оно равно константе диссоциации K_d . В настоящем документе термин «аффинность» включает равновесную константу для обратимого связывания двух агентов, и она выражена в виде K_d или EC_{50} . Аффинность связывающего белка в отношении лиганда, такая как аффинность антитела в отношении эпитопа, может составлять, например, от примерно 100 наномоль/л (нМ) до примерно 0,1 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1 пикомоль/л (пМ) или от примерно от 100 нМ до примерно 1 фемтомоль/л (фМ). В настоящем документе термин «авидность» относится к устойчивости комплекса из двух или более агентов к диссоциации после разбавления. В некоторых воплощениях аффинность выражена в терминах концентрации, при которой эффект составляет половину от максимального (EC_{50}), относящейся к концентрации агента, такого как антитело, раскрытого в настоящем документе, которая вызывает ответ, представляющий собой половину разности между исходным уровнем и максимальным ответом, после определенного времени воздействия. EC_{50} обычно используют в качестве меры активности антител.

Антитела могут быть получены любым из множества методов, известных специалистам в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Моноклональные антитела, специфичные в отношении представляющего интерес полипептида, могут быть получены, например, с использованием метода, приведенного в источнике Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, и его усовершенствованных вариантов. Также включены способы, включающие использование трансгенных животных, таких как мыши, для экспрессии человеческих антител. См., например, Neuberger et al., *Nature*

Biotechnology 14:826, 1996; Lonberg et al., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; и Lonberg et al., Internal Review of Immunology 13:65-93, 1995. Конкретные примеры включают платформу VELOCIMMUNE® от компании REGENEREX® (см., например, патент США № 6596541).

Антитела также могут быть получены или идентифицированы с использованием библиотек фагового дисплея или дрожжевого дисплея (см., например, патент США № 7244592; Chao et al., Nature Protocols. 1:755-768, 2006). Неограничивающие примеры доступных библиотек включают клонированные или синтетические библиотеки, такие как комбинаторная библиотека антител человека (HuCAL), в которой структурное разнообразие репертуара человеческих антител представлено генами переменных областей семи тяжелых цепей и семи легких цепей. Комбинация этих генов дает начало 49 каркасам в основной библиотеке. Путем наложения высоковариабельных генетических кассет (CDR = определяющие комплементарность области) на эти каркасы можно воспроизвести обширный репертуар человеческих антител. Также включены человеческие библиотеки, созданные с использованием фрагментов из человеческих донорских источников, кодирующих переменную область легкой цепи, CDR-3 тяжелой цепи, синтетической ДНК, кодирующей разнообразные CDR-1 тяжелой цепи, и синтетической ДНК, кодирующей разнообразные CDR-2 тяжелой цепи. Другие подходящие для использования библиотеки будут очевидны специалистам в данной области техники.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают набор CDR тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно расположенные между набором каркасных областей (FR) тяжелой цепи и легкой цепи, которые обеспечивают поддерживающие структуры для CDR и определяют пространственное взаимное расположение CDR друг относительно друга. В настоящем документе термин «набор CDR» относится к трем гипервариабельным областям из V-области тяжелой или легкой цепи. Начиная с N-конца тяжелой или легкой цепи эти области обозначаются как «CDR1», «CDR2» и «CDR3», соответственно. Таким образом, антигенсвязывающий сайт содержит шесть CDR, включающих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепей. Полипептид, содержащий одну CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3), в настоящем документе упоминается как «единица молекулярного распознавания». Кристаллографический анализ ряда комплексов антиген-антитело показал, что аминокислотные остатки CDR формируют обширную

поверхность контакта со связанным антигеном, причем наиболее обширный контакт антигена наблюдается с CDR3 тяжелой цепи. Таким образом, единицы молекулярного распознавания в первую очередь ответственны за специфичность антигенсвязывающего сайта.

В настоящем документе термин «набор FR» относится к четырем фланкирующим аминокислотным последовательностям, которые обрамляют CDR из набора CDR из V-области тяжелой или легкой цепи. Некоторые остатки FR могут вступать в контакт со связанным антигеном; однако FR в первую очередь ответственны за укладку V-области в антигенсвязывающий сайт, в частности остатки FR, непосредственно примыкающие к CDR. Внутри FR некоторые аминокислотные остатки и некоторые структурные особенности высококонсервативны. В связи с этим все последовательности V-области содержат внутреннюю дисульфидную петлю из примерно 90 аминокислотных остатков. Когда V-области укладываются в сайт связывания, CDR экспонируются как выступающие петлевые мотивы, которые формируют антигенсвязывающую поверхность. Общеизвестно, что существуют консервативные структурные области FR, которые влияют на свернутую форму петель CDR, обеспечивающую определенные «канонические» структуры – независимо от точной аминокислотной последовательности CDR. Кроме того, известно, что некоторые остатки FR участвуют в нековалентных междоменных контактах, которые стабилизируют взаимодействие тяжелых и легких цепей антитела.

Структуры и расположение переменных доменов иммуноглобулина могут быть определены со ссылкой на источник Kabat, E. A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987 и его обновленные версии.

Также включены «моноклональные» антитела, которые относятся к гомогенной популяции антител, где моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), которые участвуют в селективном связывании эпитопа. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против единственного эпитопа. Термин «моноклональное антитело» охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также и их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и

любую другую молекулу иммуноглобулина с модифицированной конфигурацией, содержащую антигенсвязывающий фрагмент (сайт распознавания эпитопа) с необходимой специфичностью и способностью связываться с эпитопом. Этот термин не подразумевает ограничения в отношении источника антитела или способа его получения (например, с использованием гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше под определением «антитело».

Протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, два из которых (фрагменты F(ab)) каждый содержат ковалентный гетеродимер, содержащий интактный антигенсвязывающий сайт. Фермент пепсин способен расщеплять молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, включая фрагмент F(ab')₂, который содержит оба антигенсвязывающих сайта. Фрагмент Fv для применения в соответствии с некоторыми воплощениями может быть получен путем предпочтительного протеолитического расщепления молекулы IgM и, в редких случаях, молекулы иммуноглобулина IgG или IgA. Однако фрагменты Fv чаще получают с использованием рекомбинантных методов, известных в данной области техники. Фрагмент Fv содержит нековалентный гетеродимер VH::VL, содержащий антигенсвязывающий сайт, который сохраняет большую часть способностей природной молекулы антитела к распознаванию и связыванию антигена. См. Inbar et al., PNAS USA. 69:2659-2662, 1972; Hochman et al., Biochem. 15:2706-2710, 1976; и Ehrlich et al., Biochem. 19:4091-4096, 1980.

В некоторых воплощениях рассматриваются одноцепочечные антитела Fv (scFv). Например, каппа-тела (Ill et al., Prot. Eng. 10:949-57, 1997); минителя (Martin et al., EMBO J 13:5305-9, 1994); диатела (Holliger et al., PNAS 90: 6444-8, 1993); или янусины (диатела) (Traunecker et al., EMBO J 10: 3655-59, 1991; и Traunecker et al., Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52, 1992) могут быть получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии в соответствии с изложенными в настоящей заявке принципами выбора антител, обладающих желаемой специфичностью.

Одноцепочечный полипептид Fv (scFv) представляет собой ковалентно связанный гетеродимер VH::VL, который экспрессируется слитым геном, содержащим кодирующие VH и VL гены, связанные посредством линкера, кодирующего пептид. Huston et al. (PNAS USA. 85(16):5879-5883, 1988). Был описан ряд способов распознавания химических структур для превращения объединенных вместе природно,

но разделенных химически, легкой и тяжелой полипептидных цепей из V-области антитела в молекулу scFv, которая будет укладываться в трехмерную структуру, по существу сходную со структурой антигенсвязывающего сайта. См., например, патенты США №№ 5091513 и 5132405 (Huston et al.); и патент США № 4946778 (Ladner et al.).

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты являются гуманизированными. Эти воплощения относятся к химерной молекуле, обычно полученной с использованием рекомбинантных методов, содержащей антигенсвязывающий сайт, полученный из иммуноглобулина отличного от человека вида, и остальную структуру молекулы иммуноглобулина, основанную на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо целые переменные домены, слитые с константными доменами, либо только CDR, трансплантированные в соответствующие каркасные области в переменных доменах. Сайты связывания эпитопов могут быть дикого типа или могут быть модифицированы одной или более аминокислотными заменами. Это исключает константную область как иммуноген для людей, но оставляет возможность иммунного ответа для чужеродной переменной области (LoBuglio et al., PNAS USA 86:4220-4224, 1989; Queen et al., PNAS USA. 86:10029-10033, 1988; Riechmann et al., Nature. 332:323-327, 1988). Иллюстративные способы гуманизации антител включают способы, описанные в патенте США № 7462697.

Другой подход нацелен не только на обеспечение константных областей человеческого происхождения, но также и на модификацию переменных областей для изменения их конфигурации на максимально близкую к человеческой форме. Известно, что переменные области как тяжелой, так и легкой цепей содержат три определяющие комплементарность области (CDR), которые меняются в ответ на рассматриваемые эпитопы и определяют способность к связыванию, и они фланкированы четырьмя каркасными областями (FR), которые являются относительно консервативными у данного вида и которые предположительно обеспечивают остов для CDR. При получении отличных от человеческих антител к конкретному эпитопу переменные области могут быть «подвергнуты изменению конфигурации» или «гуманизированы» путем трансплантации CDR, полученных из отличного от человеческого антитела, в FR, присутствующие в подлежащем модификации человеческом антителе. Применение этого подхода к различным антителам было описано в источниках Sato et al., Cancer Res. 53:851-856, 1993; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science

239:1534-1536, 1988; Kettleborough et al., Protein Engineering. 4:773-3783, 1991; Maeda et al., Human Antibodies Hybridoma 2:124-134, 1991; Gorman et al., PNAS USA. 88:4181-4185, 1991; Tempest et al., Bio/Technology 9:266-271, 1991; Co et al., PNAS USA. 88:2869-2873, 1991; Carter et al., PNAS USA. 89:4285-4289, 1992; и Co et al., J Immunol. 148:1149-1154, 1992. В некоторых воплощениях в гуманизированных антителах сохранены все последовательности CDR (например, гуманизированное мышиное антитело, которое содержит все шесть CDR из мышиных антител). В других воплощениях гуманизированные антитела содержат одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененные по сравнению с исходным антителом, которые также называют одной или более CDR, «полученными из» одной или более CDR от исходного антитела.

В некоторых воплощениях антитела представляют собой «химерные» антитела. В этом отношении химерное антитело состоит из антигенсвязывающего фрагмента антитела, функционально связанного или иным образом слитого с гетерологичной Fc-частью другого антитела. В некоторых воплощениях Fc-домен или гетерологичный Fc-домен имеет человеческое происхождение. В некоторых воплощениях Fc-домен или гетерологичный Fc-домен имеет мышиное происхождение. В других воплощениях гетерологичный Fc-домен может быть получен из класса Ig, отличного от класса исходного антитела, включая IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. В дополнительных воплощениях гетерологичный Fc-домен может состоять из доменов CH2 и CH3 из одного или более различных классов Ig. Как было отмечено выше в отношении гуманизированных антител, антигенсвязывающий фрагмент химерного антитела может содержать только одну или более CDR антител, описанных в настоящем документе (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR антител, описанных в настоящем документе), или может содержать целый переменный домен (V_L , V_H или и тот, и другой).

В настоящем документе субъект, «подверженный риску» развития заболевания или нежелательной реакции, может иметь или не иметь поддающиеся обнаружению заболевание или симптомы заболевания и может демонстрировать или не демонстрировать поддающиеся обнаружению заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в настоящем документе. «Подверженный риску» означает наличие у субъекта одного или более факторов риска, которые представляют собой поддающиеся определению параметры, коррелирующие с развитием заболевания, как описано в настоящем документе и известно в данной области

техники. Субъект, имеющий один или более из этих факторов риска, подвержен более высокой вероятности развития заболевания или нежелательной реакции, чем субъект, не имеющий одного или более из этих факторов риска.

«Биосовместимый» относится к материалам или соединениям, которые, как правило, не являются вредоносными для биологических функций клетки или субъекта и не приводят к какой-либо степени неприемлемой токсичности, включая аллергические и болезненные состояния.

Термин «связывание» относится к образованию непосредственной связи между двумя молекулами благодаря наличию, например, ковалентных, электростатических, гидрофобных и ионных и/или обусловленных водородными связями взаимодействий, включая такие взаимодействия как солевые мостики и водные мостики.

Термин «биодоступность» относится к системной доступности (например, уровням в крови/плазме) данного количества агента (например, антитела), вводимого пациенту. Биодоступность представляет собой абсолютный термин, который указывает на определение как времени (скорости), так и общего количества (степени) для агента, попадающего в общий кровоток из вводимой лекарственной формы.

Во всем тексте настоящего раскрытия, если контекст не предписывает иное, слова «содержать», «содержит» и «содержащий» следует понимать как подразумевающие включение указанных стадии или элемента или группы стадий или элементов, но не исключение любых других стадии или элемента или группы стадий или элементов.

Под «состоящим из» подразумевается включение и ограничение всем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под «состоящим по существу из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после фразы, и ограничение другими элементами, которые не препятствуют и не способствуют активности или действию, указанному в настоящем раскрытии для перечисленных элементов. Таким образом, фраза «состоящий по существу из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, оказывают ли они существенное влияние на активность или действие перечисленных элементов.

Термин «эффекторная функция» применительно к антителам относится к

способности этого антитела взаимодействовать с другими звеньями иммунной системы, включая, например, активацию классического пути комплемента или взаимодействие с Fc-рецепторами. Комплементзависимые пути в первую очередь обусловлены взаимодействием C1q из комплекса C1 с кластеризованными Fc-доменами антител. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) в первую очередь обусловлена взаимодействием Fc-рецепторов (FcR) на поверхности эффекторных клеток (клеток-естественных киллеров, макрофагов, моноцитов и эозинофилов), которые связываются с Fc-областью IgG и которые сами связаны с клеткой-мишенью. Fc-рецепторы (FcR) являются ключевыми иммунорегуляторными рецепторами, объединяющими опосредованный антителами (гуморальный) иммунный ответ с клеточными эффекторными функциями. Были идентифицированы рецепторы для всех классов иммуноглобулинов, включая FcγR (IgG), FcεRI (IgE), FcαRI (IgA), FcμR (IgM) и FcδR (IgD). По меньшей мере три класса рецепторов для IgG человека были обнаружены на лейкоцитах: CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIc) и CD16 (FcγRIIIa и FcγRIIIb). FcγRI классифицируют как рецептор с высокой аффинностью (наномолярный диапазон KD), тогда как FcγRII и FcγRIII характеризуются низкой или средней аффинностью (микромолярный диапазон KD). При связывании Fc запускается сигнальный путь, приводящий к секреции различных веществ, таких как литические ферменты, перфорин, гранзимы и фактор некроза опухолей, которые опосредуют разрушение клетки-мишени. Уровень эффекторной функции ADCC различен для подтипов IgG человека. Несмотря на то, что это зависит от аллотипа и конкретного FcγR, в простых терминах эффекторная функция ADCC является «высокой» для IgG1 и IgG3 и «низкой» для IgG2 и IgG4 человека.

Термин «не содержащий эндотоксинов» или «по существу не содержащий эндотоксинов» относится в целом к композициям, растворителям и/или емкостям, которые содержат не более чем следовые количества (например, количества, не оказывающие клинически неблагоприятного физиологического воздействия на субъекта) эндотоксинов и предпочтительно не поддающиеся детекции количества эндотоксинов. Эндотоксины представляют собой токсины, ассоциированные с некоторыми микроорганизмами, такими как бактерии, как правило, грамотрицательные бактерии, хотя эндотоксины могут быть обнаружены и у грамположительных бактерий, таких как *Listeria monocytogenes*. Наиболее распространенными эндотоксинами являются липополисахариды (LPS) или липоолигосахариды (LOS), обнаруженные во

внешней мембране различных грамотрицательных бактерий и представляющие собой основную патогенную особенность с точки зрения способности этих бактерий вызывать заболевание. Небольшие количества эндотоксина могут вызывать у людей, среди прочих неблагоприятных физиологических эффектов, лихорадку, снижение артериального давления и активацию воспаления и коагуляции.

Соответственно, в фармацевтическом производстве часто желательно удалить все следовые количества эндотоксина или большую их часть из лекарственных препаратов и/или емкостей с лекарственными препаратами, поскольку даже небольшие количества могут вызывать неблагоприятные эффекты у людей. Для этой цели можно использовать шкаф для депирогенизации, поскольку для разложения большинства эндотоксинов обычно необходима температура выше 300°C. Например, на основании данных для первичных упаковочных материалов, таких как шприцы или флаконы, комбинации температуры стекла 250°C и времени выдерживания 30 минут часто бывает достаточно для обеспечения 3-логарифмического сокращения содержания эндотоксинов. Предусмотрены и другие способы удаления эндотоксинов, включая, например, методы хроматографии и фильтрации, описанные в настоящем документе и известные в данной области техники.

Эндотоксины можно детектировать с использованием обычных методов, известных в данной области техники. Например, анализ с использованием лизата амёбоцитов мечехвоста, в котором используется кровь мечехвоста, является очень чувствительным анализом для детекции присутствия эндотоксина. В этом тесте очень низкие уровни LPS могут вызывать поддающуюся детекции коагуляцию лизата мечехвоста под действием мощного ферментативного каскада, который усиливает эту реакцию. Эндотоксины также можно количественно определять посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). «По существу не содержать эндотоксинов» означает, что содержание эндотоксинов может составлять менее чем примерно 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ЕЭ/мг активного соединения. Как правило, 1 нг липополисахарида (LPS) соответствует примерно 1-10 ЕЭ (единиц эндотоксина).

«Эпитоп» включает ту часть антигена или другой макромолекулы, которая способна обуславливать связывающее взаимодействие со связывающим карманом или паратопом вариабельной области антитела. Такое связывающее взаимодействие может проявляться в виде межмолекулярного контакта с одним или более аминокислотными

остатками CDR. Эпитоп может представлять собой линейную пептидную последовательность или может состоять из несмежных аминокислотных последовательностей (то есть быть «конформационным» или «прерывистым»). Таким образом, эпитопы могут быть смежными или несмежными в отношении первичной структуры антигена, например, полипептида VP1. Связывающий белок может распознавать одну или более аминокислотных последовательностей; таким образом, эпитоп может определять более одной отдельной аминокислотной последовательности. В конкретных воплощениях эпитоп содержит, состоит из или состоит по существу из примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных аминокислот (то есть линейный эпитоп) или несмежных аминокислот (то есть конформационный эпитоп) из эталонной последовательности или молекулы-мишени, описанной в настоящем документе (см., например, **таблицу VI**). Эпитопы, распознаваемые связывающим белком, могут быть определены методами пептидного картирования и анализа последовательностей, хорошо известных специалисту в данной области техники.

Термин «концентрация, при которой эффект составляет половину от максимального» или «EC₅₀» относится к концентрации агента (например, антитела), описанного в настоящем документе, при которой агент вызывает ответ, представляющий собой половину разности между исходным уровнем и максимальным ответом, после некоторого определенного времени воздействия; таким образом, EC₅₀ из ступенчатой кривой зависимости ответа от дозы представляет собой концентрацию соединения, при которой наблюдается 50% от его максимального эффекта. EC₅₀ также представляет собой концентрацию в плазме, необходимую для достижения 50% от максимального эффекта *in vivo*. Например, в некоторых случаях EC₅₀ представляет собой концентрацию антитела, при которой вирусная инфекция нейтрализуется на 50%. Аналогичным образом, «EC₉₀» относится к концентрации агента или композиции, при которой наблюдается 90% от их максимального эффекта. Например, в некоторых случаях EC₉₀ представляет собой концентрацию антител, при которой вирусная инфекция нейтрализуется на 90%. «EC₉₀» может быть рассчитана из «EC₅₀» и углового коэффициента Хилла, или она может быть определена непосредственно из данных с использованием обычных знаний в данной области техники. В некоторых воплощениях EC₅₀ агента (например, антитела) составляет менее чем примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25,

30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или 500 нМ. В некоторых воплощениях агент будет характеризоваться значением EC_{50} , составляющим примерно 1 нМ или менее.

Термин «концентрация, при которой ингибирующий эффект составляет половину от максимального» или « IC_{50} » относится к концентрации агента (например, антитела), описанного в настоящем документе, которая вызывает сигнал, представляющий собой половину (50%) разности между исходным контрольным уровнем и максимально возможным сигналом. Например, в некоторых случаях IC_{50} представляет собой концентрацию антитела, при которой заняты 50% от доступных сайтов связывания на антигене VP1.

«Период полувыведения» агента, такого как антитело, может относиться к промежутку времени, который требуется для того, чтобы агент утратил половину своей фармакологической, физиологической или другой активности по сравнению с соответствующей активностью на момент введения в сыворотку или ткань организма, или по сравнению с любым другим определенным моментом времени. «Период полувыведения» также может относиться к промежутку времени, который требуется для уменьшения количества или концентрации агента на половину от исходного количества, введенного в сыворотку или ткань организма, по сравнению с соответствующими количеством или концентрацией на момент введения в сыворотку или ткань организма, или по сравнению с любым другим определенным моментом времени. Период полувыведения может быть определен для сыворотки и/или любой одной или более выбранных тканей.

Термины «модулирование» и «изменение» включают «увеличение», «повышение» или «стимулирование», а также «уменьшение» или «снижение», как правило, в статистически значимых или физиологически значимых количестве или степени по сравнению с контролем. «Увеличенное», «возросшее» или «повышенное» количество обычно является «статистически значимым» количеством и может включать увеличение, которое составляет 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и диапазоны между ними, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.д.) от количества, присутствующего без композиции (например, в отсутствие агента) или с контрольной композицией. «Уменьшенное» или «сниженное» количество обычно является «статистически значимым» количеством и может включать уменьшение на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%,

25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (включая все целые числа и диапазоны между ними) от количества, присутствующего без композиции (например, в отсутствие агента) или с контрольной композицией. Примеры сравнений и «статистически значимых» количеств описаны в настоящем документе.

«Нейтрализация» относится к ингибированию вирусной инфекции в клетке-хозяине, о котором свидетельствует отсутствие экспрессии вирусных генов. Без привязки к какой-либо одной теории, механизмы нейтрализации с участием конкретного антитела могут включать блокирование взаимодействия капсидных белков вируса с рецепторами клеточной поверхности или нарушение любой стадии процесса проникновения и перемещения вируса до доставки вирусного генома в ядро клетки-хозяина.

Термины «полипептид», «белок» и «пептид» используются взаимозаменяемо и означают полимер из аминокислот, не ограниченный какой-либо конкретной длиной. Термин «фермент» включает полипептидные или белковые катализаторы. Указанные термины включают модификации, такие как миристоилирование, сульфатирование, гликозилирование, фосфорилирование и добавление или удаление сигнальных последовательностей. Термины «полипептид» или «белок» означают одну или более аминокислотных цепей, где каждая цепь содержит аминокислоты, ковалентно связанные посредством пептидных связей, и где указанный полипептид или белок может содержать несколько цепей, нековалентно и/или ковалентно связанных друг с другом посредством пептидных связей, имеющих последовательность природных белков, то есть белков, продуцируемых природными и конкретно нерекомбинантными клетками или генетически сконструированными или рекомбинантными клетками, и указанные термины включают молекулы, имеющие аминокислотную последовательность природного белка, или молекулы, имеющие делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот в природной последовательности. В некоторых воплощениях полипептид представляет собой «рекомбинантный» полипептид, продуцируемый рекомбинантной клеткой, которая содержит одну или более молекул рекомбинантной ДНК, сконструированных, как правило, из гетерологичных полинуклеотидных последовательностей или комбинаций полинуклеотидных последовательностей, которые иным образом не были бы обнаружены в клетке.

В настоящем документе термин «выделенный» полипептид или белок означает,

что указанный белок (1) не содержит по меньшей мере некоторых других белков, с которыми он обычно обнаруживается в природе, (2) по существу не содержит других белков из того же источника, например, из того же вида, (3) экспрессируется клеткой из другого вида, (4) был отделен от по меньшей мере примерно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других веществ, с которыми он связан в природе, (5) не связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с частями белка, с которым этот «выделенный белок» связан в природе, (6) функционально связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (7) не встречается в природе. Такой выделенный белок может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК, которая может иметь синтетическое происхождение, или любой их комбинацией. В некоторых воплощениях выделенный белок по существу не содержит белков или полипептидов или других загрязняющих примесей, обнаруженных в его природном окружении, которые могут препятствовать его применению (терапевтическому, диагностическому, профилактическому, с целью исследований или иному). Термин «выделенное антитело» включает антитело, которое по существу не содержит других антител, обладающих другими антигенными специфичностями. Однако выделенное антитело, которое специфично связывается с одним антигеном, может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов. Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ.

Термин «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» включает мРНК, РНК, кРНК, кДНК и ДНК. Указанный термин обычно относится к полимерной форме нуклеотидов, имеющей длину по меньшей мере 10 оснований, либо к рибонуклеотидам, либо к дезоксирибонуклеотидам, либо к модифицированной форме нуклеотида любого типа. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК. Термины «выделенная ДНК», «выделенный полинуклеотид» и «выделенная нуклеиновая кислота» относятся к молекуле, которая была выделена в форме, не содержащей тотальной геномной ДНК конкретного вида. Таким образом, выделенный сегмент ДНК, кодирующий полипептид, относится к сегменту ДНК, который содержит одну или более кодирующих последовательностей, при этом он по существу отделен или очищен от тотальной геномной ДНК вида, из которого получен сегмент ДНК.

В некоторых воплощениях может быть определена «чистота» любого данного

агента (например, антитела) в композиции. Например, некоторые композиции могут содержать агент, такой как полипептидный агент, чистота которого составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% из расчета на количество белка или из расчета на массу, включая все десятичные дроби и промежуточные диапазоны, как определено, например, без какого-либо ограничения, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), хорошо известного вида колоночной хроматографии, часто используемого в биохимии и аналитической химии для разделения, идентификации и количественного определения соединений.

Термин «эталонная последовательность» обычно относится к кодирующей нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности, с которой сравнивают другую последовательность. Все полипептидные и полинуклеотидные последовательности, описанные в настоящем документе, включены в качестве эталонных последовательностей, включая последовательности, описанные с помощью названия, и последовательности, описанные в таблицах и Перечне последовательностей.

Некоторые воплощения включают биологически активные «варианты» и «фрагменты» полипептидов (например, антител), описанных в настоящем документе, и кодирующих их полинуклеотидов. «Варианты» содержат одну или более замен, добавлений, делеций и/или вставок по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом (см., например, таблицы и Перечень последовательностей). Вариант полипептида или полинуклеотида содержит аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая имеет идентичность, или сходство, или гомологию последовательностей с эталонной последовательностью, составляющие по меньшей мере примерно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, как описано в настоящем документе, и по существу сохраняет активность этой эталонной последовательности. Также включены последовательности, которые состоят из эталонных последовательностей или отличаются от них наличием добавления, делеции, вставки или замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 или более аминокислот или нуклеотидов, и которые по существу сохраняют активность этой эталонной последовательности. В некоторых воплощениях добавления или делеции включают добавления и/или делеции в области С-конца и/или N-конца.

В настоящем документе термины «идентичность последовательностей» или,

например, содержащие «последовательность, которая на 50% идентична», относятся к степени, в которой последовательности являются идентичными на основании соответствия их нуклеотидов или на основании соответствия их аминокислот в пределах окна сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательностей» может быть рассчитан при сравнении двух оптимально выравненных последовательностей в пределах окна сравнения путем определения числа положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот (например, А, Т, С, G, I) или идентичные аминокислотные остатки (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречаются в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (то есть на размер окна) и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения может быть выполнено с помощью компьютеризированных реализаций алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Висконсин, США) или путем оценки и наилучшего выравнивания (то есть приводящего к наибольшему проценту гомологии в пределах окна сравнения), полученного любым из различных выбранных способов. Также можно сделать ссылку на семейство программ BLAST, раскрытых, например, в источнике Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997.

Термин «растворимость» относится к свойству агента (например, антитела), предложенного в настоящем документе, растворяться в жидком растворителе и образовывать гомогенный раствор. Растворимость обычно выражают либо в виде концентрации по массе растворенного вещества на единицу объема растворителя (г растворенного вещества на кг растворителя, г на дл (100 мл), мг/мл и т.д.), молярности, моляльности, мольной доли, либо в виде других сходных описаний концентрации. Максимальное равновесное количество растворенного вещества, которое может раствориться в единице количества растворителя, представляет собой растворимость этого растворенного вещества в этом растворителе при определенных условиях, включая температуру, давление, pH и природу растворителя. В некоторых воплощениях растворимость определяют при физиологическом pH или другом pH, например, при pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 7,4, pH 7,6, pH 7,8 или pH 8,0 (например, примерно pH 5-8). В

некоторых воплощениях растворимость определяют в воде или физиологическом буфере, таком как PBS или NaCl (с NaPO_4 или без него). В конкретных воплощениях растворимость определяют при относительно более низком pH (например, pH 6,0) и относительно более высоком содержании соли (например, 500 mM NaCl и 10 mM NaPO_4). В некоторых воплощениях растворимость определяют в биологической жидкости (растворителе), такой как кровь или сыворотка. В некоторых воплощениях температура может быть примерно равна комнатной температуре (например, примерно 20, 21, 22, 23, 24, 25°C) или примерно равна температуре тела (37°C). В некоторых воплощениях агент имеет растворимость, составляющую по меньшей мере примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл при комнатной температуре или при 37°C.

«Субъект» или «нуждающийся в этом субъект» или «пациент» или «нуждающийся в этом пациент» включает субъекта-млекопитающего, такого как субъект-человек.

«По существу» или «практически» означает почти полностью или полностью, например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от некоторого данного количества.

Под «статистически значимым» подразумевается, что результат, вероятно, был получен не случайно. Статистическая значимость может быть определена любым способом, известным в данной области техники. Обычно используемые меры значимости включают р-значение, которое представляет собой частоту или вероятность, с которой произошло бы наблюдаемое событие, если бы нулевая гипотеза была верна. Если полученное р-значение меньше уровня значимости, то нулевая гипотеза отклоняется. В простых случаях уровень значимости определяется как р-значение, составляющее 0,05 или менее.

«Терапевтический ответ» относится к облегчению симптомов (независимо от того, является ли оно устойчивым) в результате введения одного или более терапевтических агентов.

В настоящем документе термины «терапевтически эффективное количество», «терапевтическая доза», «профилактически эффективное количество» или «диагностически эффективное количество» представляют собой количество агента (например, антитела против полиомавируса), необходимое для обеспечения желаемого биологического ответа после введения.

В настоящем документе термин «лечение» в отношении субъекта (например,

млекопитающего, такого как человек) или клетки представляет собой любой тип вмешательства, применяемый в попытке изменить естественное развитие состояния у индивидуума или клетки. Лечение включает, но не ограничивается им, введение фармацевтической композиции и может быть проведено либо профилактически, либо после возникновения патологического события или контакта с причинным агентом. Также включены «профилактические» способы лечения, которые могут быть направлены на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, которое лечат, задерживание начала этого заболевания или состояния, или уменьшение тяжести его начала. «Лечение» или «профилактика» не обязательно означает полное устранение, излечение или предупреждение заболевания, или состояния или ассоциированных с ним симптомов.

Термин «дикий тип» относится к гену или продукту гена, который наиболее часто обнаруживается в популяции и, таким образом, произвольно обозначает «нормальную» форму гена или форму гена «дикого типа».

Каждое воплощение в настоящем описании следует применять к любому другому воплощению, если явно не указано иное.

Как было отмечено выше, воплощения настоящего изобретения относятся к режимам дозирования и оптимальным дозам одного или более нейтрализующих полиомавирус антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты.

Например, некоторые воплощения относятся к режиму дозирования для лечения полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающей

(а) парентеральное введение указанному субъекту дозы нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса;

(б) определение в сыворотке или ткани субъекта содержания указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(в) введение дополнительной дозы указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до того, как минимальная концентрация в сыворотке или ткани (C_{trough}) снизится до менее чем примерно 3-860 мкг/мл,

где указанный режим дозирования обеспечивает поддержание в сыворотке или ткани концентрации указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента выше C_{trough} в течение всего периода лечения.

«Минимальная концентрация» или « C_{trough} » относится к самой низкой концентрации агента в сыворотке или ткани перед введением следующей дозы. При периодических введениях C_{trough} обычно определяют непосредственно перед введением следующей дозы, например, для поддержания оптимальной нейтрализующей вирус активности и во избежание превышения дозы.

В некоторых воплощениях C_{trough} на стадии (в) определяют для плазмы, и режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в плазме снизится до менее чем примерно 150-860 мкг/мл или примерно 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850 или 860 мкг/мл.

В некоторых воплощениях C_{trough} на стадии (в) представляет собой концентрацию для конкретной ткани, например, почечной ткани или ткани мочевого пузыря. Исключительно в иллюстративных целях, концентрация в плазме антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть использована для определения концентрации в почечной ткани (например, C_{trough} в почечной ткани составляет примерно 13,7% от C_{trough} в плазме) или концентрации в ткани мочевого пузыря (например, C_{trough} в ткани мочевого пузыря составляет примерно 1% от C_{trough} в плазме).

В некоторых воплощениях C_{trough} на стадии (в) определяют для почечной ткани, и режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в почечной ткани снизится до менее чем примерно 23,5-120 мкг/мл или примерно 23,5, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 или 120 мкг/мл. В некоторых из этих и сходных с ними воплощений субъект имеет или подвержен риску наличия ассоциированной с вирусом ВК нефропатии.

В некоторых воплощениях C_{trough} на стадии (в) определяют для ткани мочевого пузыря, и режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в ткани мочевого пузыря снизится до менее чем примерно 3-10 мкг/мл или примерно 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мкг/мл. В некоторых из этих и сходных с ними воплощений субъект имеет или подвержен риску наличия ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита.

Некоторые воплощения, применяемые либо отдельно, либо как часть режима дозирования, описанного в настоящем документе, относятся к оптимальным дозам

одного или более нейтрализующих полиомавирус антител, включая их антигенсвязывающие фрагменты. Например, некоторые воплощения относятся к способам лечения полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающим парентеральное введение указанному субъекту дозы нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса, где доза составляет примерно 10-30 мг/кг, например, примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг, или примерно 10-15, 10-20, 10-25, 15-20, 15-25, 15-30, 20-30 или 25-30 мг/кг.

Термины «ВКВ» или «вирус ВК» относятся к представителю семейства *Polyomaviridae*, роду *Orthopolyomavirus*. Полиомавирусы представляют собой икосаэдрические, безоболочечные, содержащие двухцепочечную ДНК вирусы с геномом, состоящим из примерно 5000 пар оснований. Их диаметр составляет примерно 40-45 нм (Bennett et al., *Microbes and Infection*. 14:672-683, 2012). «JCV» или «вирус JC» относится к представителю семейства *Polyomaviridae*, роду *Orthopolyomavirus*. JCV является родственным ВКВ и также представляет собой икосаэдрический, безоболочечный, содержащий двухцепочечную ДНК вирус с геномом, состоящим из примерно 5000 пар оснований. Его диаметр составляет примерно 40-45 нм (Johne et al., *Arch. Virol.* 156:1627-1634, 2011).

Как было отмечено выше, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с белком VP1 полиомавируса. Термин «VP1» относится к основному белку субъединицы капсида полиомавируса. «Пентамеры VP1» состоят из пяти мономеров VP1. Примеры белков VP1 представлены в **таблице V1** ниже.

Таблица V1. Последовательности белков VP1		
Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
VP1 ВКВ генотипа I	MARTKRKGECPGAAPKKPKPEVQVPKLLIKGGVEVLEV KTGVDAITEVECFLNPEMGDPDENLRGFSCLKLSAENDFS SDSPERKMLPCYSTARIPLPNLNEDLTGNNLLMWEAVTV QTEVIGITSMLNLHAGSQKVHEHGGGKPIQGSNFHFFAV GGDPLEMQGVLMNYRTKYPEGTITPKNPTAQSQVMNTD HKAYLDKNNAYPVECWIPDPSRNENTRYFGTFTGGENV PPVLHVTNTATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAADICGL	1

	FTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPYPISFLLSDLI NRRRTQRVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTERLPGDPMI RYIDKQGQLQTKML	
VP1 BKV генотипа II	MAPTKRKGECPGAAPKKPKEPVQVPKLLIKGGVEVLEV KTGVDAITEVECFLNPEMGDPDDNLRGYSLKLTAEAF DSDSPDKKMLPCYSTARIPNLNEDLTCGNLLMWEAV TVKTEVIGITSMLNLHAGSQKVHENGSGKPVQGSNFHFF AVGGDPLEMQGVLMNYRTKYPQGTITPKNPTAQSQVM NTDHKAYLDKNNAYPVECWIPDPSRNENTRYFGTYTGG ENVPPVLHVTNTATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAADI CGLFTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPYPISFLLS DLINRRTQKVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTEQLPGDP DMIRYIDRQGQLQTKMV	2
VP1 BKV генотипа III	MAPTKRKGECPGAAPKKPKEPVQVPKLLIKGGVEVLEV KTGVDAITEVECFLNPEMGDPDDHLRGYSQHLSAENAF DSDSPDKKMLPCYSTARIPNLNEDLTCGNLLMWEAV TVKTEVIGITSMLNLHAGSQKVHENGSGKPVQGSNFHFF AVGGDPLEMQGVLMNYRTKYPQGTITPKNPTAQSQVM NTDHKAYLDKNNAYPVECWIPDPSKNENTRYFGTYTGG ENVPPVLHVTNTATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAADI CGLFTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPYPISFLLS DLINRRTQKVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTEQLPGDP DMIRYIDRQGQLQTKMV	3
VP1 BKV генотипа IV	MAPTKRKGECPGAAPKKPKEPVQVPKLLIKGGVEVLEV KTGVDAITEVECFLNPEMGDPDNDLRGYSLRLTAETA FDSDSPDRKMLPCYSTARIPNLNEDLTCGNLLMWEAVTV KTEVIGITSMLNLHAGSQKVHENGSGKPIQGSNFHFFAV GGDPLEMQGVLMNYRTKYPEGTVTPKNPTAQSQVMNT DHKAYLDKNNAYPVECWIPDPSRNENTRYFGTYTGGEN VPPVLHVTNTATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAADICG LFTNSSGTQQWRGLPRYFKIRLRKRSVKNPYPISFLLSDLI NRRRTQRVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTEQLPGDPMI RYIDRQGQLQTKMV	4

VP1 JCV	MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITE VECFLTPMGDPDEHLRGFSKISISIDTFESDSPNKDMLP CYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTL MNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGGEALELQ GVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKN KAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNT ATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQ QWRGLSRYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRV DGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR YGQLQTKML	5
---------	--	---

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с одним или более белками VP1, выбранными из **таблицы V1**. В конкретных воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются или вступают в перекрестную реакцию с каждым из белков VP1, представленных в SEQ ID NO: 1-5, то есть связываются с VP1 из всех серотипов I-IV вируса BКV и вируса JC. В конкретных воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует или иным образом уменьшает или ингибирует репликацию всех серотипов I-IV вируса BКV и вируса JC. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с конформационным эпитопом VP1, который содержит 1, 2 или 3 определенных контактирующих остатка в VP1, например, любой один или более из Y169, R170 и K172 из VP1.

В некоторых воплощениях изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются присутствием или содержат переменную область тяжелой цепи (V_H), которая содержит одну или более последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR), включая последовательности V_H CDR1, V_H CDR2 и V_H CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), которая содержит одну или более последовательностей CDR, таких как последовательности V_L CDR1, V_L CDR2 и V_L CDR3. Примеры последовательностей V_H , V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L , V_L CDR1, V_L CDR2 и V_L CDR3 представлены в **таблице A1** и **таблице A2** ниже.

Таблица A1. Последовательности CDR		
Описание	Последовательность	SEQ ID

		NO:
MAU868		
V _H CDR1	GFTFN NY WMT	6
V _H CDR2	NIKKDGSEKYYVDSVRG	7
V _H CDR3	VRSGRYFALDD	8
V _L CDR1	GGDNIGSRPVH	9
V _L CDR2	DDSNRPS	10
V _L CDR3	QVWSSSTDHP	11

Таблица A2: Последовательности VH и VL		
Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
MAU868		
Варибельная область тяжелой цепи (V _H)	QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAAS GFTFN NY WMT WVRQAPGKGLEWVAN NIKKDGSEKYYVDSVRGRFTI SRDNAKNSLFLQMNSLRPEDTAVYFCAT VRSGRYFA LDD WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	12
Варибельная область легкой цепи (V _L)	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITC GGDNIGSRPVH WYQ QKPGQAPILVVY DDSNRPS GIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYC QVWSSSTDHP FGGGTKVTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS	13

Таким образом, в некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область V_H , которая содержит последовательности V_HCDR1 , V_HCDR2 и V_HCDR3 , выбранные из **таблицы A1**, и их варианты, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса (выбранным, например, из **таблицы V1**); и область V_L , которая содержит последовательности V_LCDR1 , V_LCDR2 и V_LCDR3 , выбранные из **таблицы A1**, и их варианты, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса (выбранным, например, из **таблицы V1**). В некоторых воплощениях последовательности CDR являются следующими: последовательности V_HCDR1 , V_HCDR2 и V_HCDR3 содержат SEQ ID NO: 6-8, соответственно, и последовательности V_LCDR1 , V_LCDR2 и V_LCDR3 содержат SEQ ID NO: 9-11, соответственно, включая их варианты, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса. Включены варианты, которые имеют в совокупности 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в одной или более областях CDR, например, одной или более последовательностях V_HCDR1 , V_HCDR2 , V_HCDR3 , V_LCDR1 , V_LCDR2 и/или V_LCDR3 , описанных в настоящем документе. Примеры «изменений» включают аминокислотные замены, добавления и делеции.

В некоторых воплощениях последовательность V_H по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из **таблицы A2**, включая, например, случай, когда последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в одной или более каркасных областях. В некоторых воплощениях последовательность V_L по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из **таблицы A2**, включая, например, случай, когда последовательность V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в одной или более каркасных областях. Конкретные примеры включают одну или более замен, выбранных из V5Q, G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q. В некоторых воплощениях последовательности V_H и V_L антитела или его антигенсвязывающего фрагмента являются следующими: последовательность V_H содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 12, и последовательность V_L содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 13. В конкретных воплощениях антитело представляет собой MAU868 (также P8D11).

Некоторые режимы дозирования или способы лечения включают диагностику полиомавирусной инфекции у субъекта, например, путем выявления вирурии ВК или JC или виремии ВК или JC. В некоторых воплощениях режим дозирования включает стадию идентификации или диагностики генотипа вируса ВК или вируса JC у субъекта. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный

из одного или более из генотипов I, II, III и IV. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает только один из генотипов I, II, III или IV вируса ВК. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает два, три или все четыре из генотипов I, II, III и/или IV вируса ВК. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус JC, отдельно или в сочетании с любым одним, двумя, тремя или четырьмя из генотипов I, II, III и/или IV вируса ВК. Способы идентификации, диагностики или определения виремии, вирурии и генотипов вируса ВК и вируса JC известны в данной области техники и включают ПЦР в режиме реального времени, анализ методом высокоразрешающего плавления (HRMA) и другие способы (см., например, Luo et al., *J Virol.* 83:2285-2297, 2009; Gambarino et al., *Mol Biotechnol.* 49:151-8, 2011; Matsuda et al., *J Med Virol.* 83:2128-34, 2011; и Toan et al., *Transplantation Proceedings.* 51:2683-2688, 2019).

В некоторых воплощениях субъект находится в состоянии «иммунной недостаточности» или имеет «иммунодефицит», что относится к состоянию, при котором способность иммунной системы субъекта бороться с инфекционными заболеваниями значительно снижена или полностью отсутствует. В некоторых воплощениях иммунодефицит является вторичным, или приобретенным, и представляет собой последствие хирургического вмешательства, травмы или лечения с применением различных агентов, например, иммуносупрессивных лекарственных средств, связанных с трансплантацией органов или клеток, глюкокортикоидов, химиотерапевтических средств и модифицирующих заболевание противоревматических лекарственных средств, или воздействия токсинов из окружающей среды, таких как тяжелые металлы, пестициды или нефтехимические вещества. Для аспектов, связанных с лечением, термин «иммуносупрессия» в более общем смысле относится к благоприятным и возможным неблагоприятным эффектам снижения функции иммунной системы, тогда как термин «иммунодефицит» относится главным образом к неблагоприятному эффекту повышения риска инфекции. В некоторых случаях вторичные иммунодефициты вызваны конкретными заболеваниями или состояниями. Примеры включают многие виды рака, в частности рака костного мозга и клеток крови (например, лейкоз, лимфому, множественную миелому), и некоторые хронические инфекции. Иммунодефицит также является отличительным признаком синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Различные гормональные и метаболические нарушения, включая анемию, гипотиреоз и

гипергликемию, также могут вызывать иммунодефициты. В некоторых случаях иммунодефицит связан со старением, например, когда возраст субъекта составляет примерно или по меньшей мере примерно 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 лет. В некоторых случаях иммунодефицит является первичным, или врожденным, и обусловлен генетическим нарушением у субъекта.

Примеры иммунодефицитов включают гуморальные иммунодефициты (включая дефицит или дисфункцию В-клеток), которые обычно характеризуются гипогаммаглобулинемией (уменьшением содержания одного или более типов антител) и/или агаммаглобулинемией (отсутствием выработки всех или большей части антител); дефициты Т-клеток, характеризующиеся, например, уменьшением количества Т-клеток или гиперчувствительностью замедленного типа в кожных тестах; дефицит гранулоцитов, включая уменьшение количества гранулоцитов (гранулоцитопению или, в случае отсутствия гранулоцитов, агранулоцитоз), таких как нейтрофильные гранулоциты (называемое нейтропенией), и снижение функции отдельных гранулоцитов; асплению, характеризующуюся недостаточностью функции селезенки; и дефицит комплемента, характеризующийся снижением функции системы комплемента.

В некоторых воплощениях субъект близок к тому, чтобы быть подвергнутым, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, например, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток. Примеры трансплантатов органов включают трансплантаты почки (или почечный трансплантат), сердца, печени, легкого, поджелудочной железы, кишечника, вилочковой железы и матки. Примеры трансплантатов клеток включают трансплантаты гемопоэтических клеток (НСТ), такие как, среди прочих, сингенные, аутологичные и аллогенные НСТ. В конкретных воплощениях трансплантат представляет собой аллотрансплантат, то есть трансплантат органа, ткани или клетки между двумя генетически неидентичными представителями одного и того же вида. В некоторых воплощениях субъект имеет иммунодефицит, который ассоциирован с или вызван иммуносупрессивной терапией, связанной с процедурой трансплантации.

В некоторых воплощениях субъект имеет один или более симптомов вирусной инфекции ВК или JC. Например, в некоторых случаях субъект имеет одно или более из нарушения четкости зрения или других изменений зрения, мочи коричневого или красного цвета, боли при мочеиспускании, снижения функции почек, затрудненного мочеиспускания, кашля, простуды, затрудненного дыхания, лихорадки, мышечной боли,

мышечной слабости и/или судорог. Такие симптомы могут возникать, например, из-за сужения мочеточников, интерстициального нефрита или в более общем случае воспаления почек.

В конкретных воплощениях субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии (PML). Термины «нефропатия ВКV» или «ассоциированная с вирусом ВК нефропатия» или «ВКVAN» относятся к воспалительной интерстициальной нефропатии, возникающей вследствие литической инфекции вируса ВК, характеризующейся вирусными цитопатогенными изменениями и экспрессией вирусных генов, преимущественно в эпителии почечных канальцев. «Геморрагический цистит» или «ассоциированный с вирусом ВК геморрагический цистит» относится к воспалению мочевого пузыря, обычно определяемому по симптомам в нижних мочевыводящих путях, которые включают дизурию, гематурию и кровотечение. «Ассоциированная с вирусом JC PML» относится к редкому и часто летальному вирусному заболеванию, характеризующемуся прогрессирующим повреждением или воспалением белого вещества головного мозга, часто во многих местах (многоочаговым).

Как было отмечено выше, режимы дозирования, описанные в настоящем документе, включая способы лечения полиомавирусной инфекции, включают стадию или стадии мониторинга или определения в сыворотке или ткани субъекта содержания нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например, для достижения режима дозирования, который обеспечивает поддержание C_{trough} антитела в сыворотке или ткани на минимальном уровне или в пределах минимального диапазона. В некоторых воплощениях промежуток времени между стадией введения дозы (а) и стадией мониторинга или определения содержания (б) составляет примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или 1, 2 или 3 месяца. Некоторые воплощения включают (б) определение содержания в сыворотке или ткани субъекта примерно один раз каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или примерно 1-3 раза каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или примерно 1-6 раз каждые 1, 2 или 3 месяца.

Некоторые воплощения включают введение дополнительной дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до того, как C_{trough} в сыворотке или ткани снизится ниже определенного уровня по сравнению с EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении полиомавируса в сыворотке или ткани субъекта. То есть, некоторые режимы дозирования и способы лечения, предложенные в настоящем документе, обеспечивают поддержание C_{trough} на минимальном уровне или в пределах диапазона относительно EC_{50} для полиомавируса.

Например, в некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа I, и концентрация в ткани, например концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 2618 до примерно 3775 до примерно 13061 раза (например, в примерно 2600, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500 или 13000 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,009 \pm 0,010$ мкг/мл. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа I, и концентрация в ткани, например концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 500 до примерно 692 до примерно 1000 раз (например, в примерно 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,009 \pm 0,010$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа II, и концентрация в ткани, например, концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 589 до примерно 849 до примерно 2942 раз (например, в примерно 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,040 \pm 0,025$ мкг/мл. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа II, и концентрация в ткани, например концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 100 до примерно 156 до примерно 200 раз (например, в примерно 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,040 \pm 0,025$ мкг/мл.

В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа III, и концентрация в ткани, например концентрация в почечной ткани, при

C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 253 до примерно 365 до примерно 1265 раз (например, в примерно 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1150, 1200, 1250, 1300 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,093 \pm 0,057$ мкг/мл. В некоторых воплощениях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа III, и концентрация в ткани, например концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 50 до примерно 67 до примерно 100 раз (например, в примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,093 \pm 0,057$ мкг/мл.

В некоторых случаях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа IV, и концентрация в ткани, например концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 1122 до примерно 1618 до примерно 5604 раз (например, в примерно 1100, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,021 \pm 0,020$ мкг/мл. В некоторых случаях полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа IV, и концентрация в ткани, например концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 100 до примерно 297 до примерно 500 раз (например, в примерно 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,021 \pm 0,020$ мкг/мл.

В некоторых случаях полиомавирусная инфекция включает вирус JC, и концентрация в ткани при C_{trough} представляет собой значения, которые в по меньшей мере от примерно 29 до примерно 110 до примерно 158 до примерно 547 раз (например, в 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,215 \pm 0,130$ мкг/мл.

Уровни EC_{50} и C_{trough} для нейтрализующего полиомавирус антитела против генотипа вируса ВК или вируса JC могут быть определены в соответствии с обычными методами, используемыми в данной области техники. Например, уровни C_{trough} могут быть определены посредством валидированного анализа на основе ELISA типа «сэндвич» с использованием колориметрической детекции, среди прочих методов, и

EC₅₀ может быть определена в анализе *ex vivo* с использованием клеток (см., например, **пример 2**).

Как было отмечено выше, в случае применения *in vivo* для лечения заболеваний человека, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и другие агенты, описанные в настоящем документе, до введения обычно включают в одну или более фармацевтических или терапевтических композиций.

Таким образом, некоторые воплощения относятся к фармацевтическим или терапевтическим композициям, которые содержат терапевтически эффективные количество или дозу нейтрализующего полиомавируса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе. В некоторых случаях фармацевтическая или терапевтическая композиция, описанная в настоящем документе, содержит нейтрализующее полиомавируса антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в комбинации с фармацевтически или физиологически приемлемым носителем или эксципиентом. В некоторых воплощениях носитель содержит гистидин и/или глицин, сахарид, такой как сахароза, и/или полиол, такой как полисорбат. В конкретных воплощениях носитель содержит гистидин, сахарозу и полисорбат.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, в значительной степени не образуют агрегаты, имеют желаемую растворимость и/или имеют профиль иммуногенности, подходящий для применения у людей, как известно в данной области техники. Таким образом, в некоторых воплощениях композиция, содержащая нейтрализующее полиомавируса антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит примерно или менее чем примерно 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% агрегатов, как определено, например, методом динамического рассеяния света. Некоторые композиции содержат нейтрализующее полиомавируса антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые по меньшей мере на примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90% или примерно 95% являются монодисперсными относительно наблюдаемой молекулярной массы неагрегированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Введение композиции может быть обеспечено множеством различных путей, включая парентеральное и энтеральное введение. Примеры парентерального введения включают внутривенное, подкожное, интратекальное, эпидуральное,

интрацеребральное, интрацеребровентрикулярное, интраназальное, внутримышечное, внутриартериальное и ингаляционное введение. Примеры энтерального введения включают пероральное или ректальное введение. Конкретные воплощения включают введение путем внутривенной инфузии, например, путем внутривенной болюсной инъекции, внутривенной инфузии (например, в течение периода примерно 10-90 минут или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, или 90 минут), или путем введения с возрастающей дозой или непрерывного внутривенного введения, например, с помощью инфузионного насоса или амбулаторного инфузионного устройства.

Точная доза и продолжительность лечения зависят от заболевания, которое лечат, и могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов исследования или путем исследования композиций в модельных системах, известных в данной области техники, и экстраполяции полученных с их помощью результатов. Также могут быть проведены контролируемые клинические испытания. Дозы также могут быть разными в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо облегчить. В целом фармацевтическую композицию готовят и вводят для обеспечения терапевтически полезного эффекта при сведении к минимуму нежелательных побочных эффектов. Композицию можно вводить один раз, либо ее можно разделить на несколько меньших доз для введения через промежутки времени. Для каждого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования могут быть скорректированы с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями.

Терапевтические или фармацевтические композиции в соответствии с некоторыми воплощениями настоящего изобретения приготовлены в виде состава таким образом, чтобы обеспечить биодоступность содержащихся в них активных ингредиентов при введении композиции субъекту или пациенту. Композиции, которые будут введены субъекту или пациенту, могут иметь форму одной или более единиц дозы. Используемые способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области техники; например, см. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Композиция для введения будет, как правило, содержать терапевтически эффективное количество агента, описанного в настоящем документе, для лечения представляющего интерес заболевания или состояния.

В некоторых воплощениях доза нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например доза на стадии (а), составляет от

примерно 1 до примерно 100 мг/кг, или примерно 10-30 мг/кг, или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. В некоторых воплощениях дополнительная доза на стадии (в) является такой же, как и доза на стадии (а), или отлична от нее, например, составляет от примерно 1 до примерно 100 мг/кг, или примерно 10-30 мг/кг, или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. В некоторых воплощениях промежуток времени между стадиями (а) и (в) составляет примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или 1, 2 или 3 месяца.

В некоторых воплощениях доза нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 10-30 мг/кг, или примерно 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30 или 25-30 мг/кг, или примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг. В некоторых случаях доза 10-30 мг/кг обеспечивает оптимальную нейтрализующую активность (IC_{50}) в сыворотке субъекта в отношении полиомавируса ВК или JC, определяемую в анализе содержания вируса *in vitro* или *ex vivo* (см., например, **фигуру 2**, где нейтрализующая активность возрастала вплоть до дозы 30 мг/кг, что свидетельствует о том, что максимальная нейтрализующая активность была достигнута при дозах от более 10 мг/кг до менее 30 мг/кг). Примеры анализов *in vitro* или *ex vivo* для определения репликации вируса ВК или JC включают использование первичных клеток эпителия проксимальных почечных канальцев (RPTE), выращиваемых и поддерживаемых в среде для клеток RPTE, как описано, например, в источнике Abend et al. (J Virol. 81(1):272-279, 2007) и Low et al. (Virology. 323:182-8, 2004). В конкретных воплощениях дозу вводят внутривенно или подкожно.

В некоторых воплощениях режимы дозирования и способы лечения, описанные в настоящем документе, характеризуются одним или более фармакокинетическими профилями (см. примеры, включая **таблицу E2**). Например, после введения нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% или более от концентрации циркулирующего в сыворотке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента проникает в интерстициальные пространства инфицированного органа, то есть органа, инфицированного вирусом ВК или вирусом JC. Примеры инфицированных органов включают мочевой пузырь, почки и головной мозг. В некоторых воплощениях

среднее значение клиренса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 0,0760-0,0996 мл/сутки/кг. В некоторых воплощениях средний объем распределения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 49,8-81,9 мл/кг.

Также включены способы комбинированной терапии, например, включающие введение нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с дополнительным агентом, таким как иммуносупрессивный агент. Таким образом, некоторые фармацевтические или терапевтические композиции также содержат дополнительный агент, например, иммуносупрессивный агент. Примеры иммуносупрессивных агентов включают ингибиторы монофосфатдегидрогеназы, ингибиторы синтеза пуринов, ингибиторы кальциневрина, ингибиторы mTOR, микофенолата мофетил (MMF), микофенолат натрия, азатиоприн, такролимус, сиролимус и циклоспорин.

Комбинированная терапия, описанная в настоящем документе, может включать введение единого фармацевтического лекарственного состава, который содержит нейтрализующее полиомавирус антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный агент, а также введение композиций, содержащих нейтрализующее полиомавирус антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный агент, каждый из которых находится в виде своего собственного отдельного фармацевтического лекарственного состава. Например, нейтрализующее полиомавирус антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный агент могут быть введены субъекту совместно в виде единой лекарственной композиции, либо каждый агент вводят в виде отдельных лекарственных составов. Например, нейтрализующее полиомавирус антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный терапевтический агент могут быть введены субъекту совместно в виде единой лекарственной композиции для парентерального введения, такой как солевой раствор или другой физиологически приемлемый раствор, либо каждый агент вводят в виде отдельных лекарственных составов для парентерального введения. Если используют отдельные лекарственные составы, то композиции могут быть введены по существу в одно и то же время (то есть одновременно) или в отдельные смещенные друг относительно друга моменты времени (то есть последовательно) и в любом порядке. Под комбинированной терапией понимают все приведенные выше способы.

В некоторых воплощениях режимы дозирования или способы лечения,

описанные в настоящем документе, обеспечивают уменьшение виремии и/или вирурии ВК или JC у субъекта, например, на примерно или по меньшей мере примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000% или 5000% или более, по сравнению с контролем (например, по сравнению с состоянием в отсутствие композиции или до лечения с применением нейтрализующего полиомавирус антитела или его антигенсвязывающего фрагмента). В некоторых воплощениях режимы дозирования или способы лечения, описанные в настоящем документе, обеспечивают уменьшение или облегчение у субъекта одного или более симптомов, ассоциированных с вирусом ВК или JC, например, таких симптомов как нарушение четкости зрения или другие изменения зрения, моча коричневого или красного цвета, боль при мочеиспускании, снижение функции почек, затрудненное мочеиспускание, кашель, простуда, затрудненное дыхание, лихорадка, мышечная боль, мышечная слабость и/или судороги.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИТИКА MAU868, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВ ВИРУСА Ък

Были проведены анализы для характеристики активности MAU868 в отношении связывания и нейтрализации вируса *in vitro*. Аффинность связывания определяли с использованием анализа методом равновесного титрования в растворе. Нейтрализацию инфекции ВКV в первичных клетках эпителия проксимальных почечных канальцев (RPTE) оценивали путем определения количества TAg-экспрессирующих клеток с использованием анализа на основе иммунофлуоресцентной многопараметрической визуализации. Появление вариантов ВКV, ассоциированных с устойчивостью (RAV), со сниженной восприимчивостью к MAU868 изучали в двух долгосрочных исследованиях с отбором с использованием генотипов I и IV ВКV в клетках RPTE и НЕК-293. Кристаллографические исследования проводили с использованием одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) MAU868, связанного с пентамерами VP1.

MAU868 характеризовалось аффинностью связывания в пикомолярном диапазоне и нейтрализующей активностью в субнанолярном диапазоне в отношении 4 основных генотипов ВКV со значениями EC₅₀ и EC₉₀ в диапазоне от 0,009 до 0,093 мкг/мл (от 0,062 до 0,645 нМ) и от 0,102 до 4,160 мкг/мл (от 0,708 до 28,865 нМ), соответственно (см., например, **таблицу E1** ниже).

Таблица Е1. Аффинность связывания и нейтрализующая активность MAU868 в отношении генотипов BКV *in vitro*

Генотип	KD (пМ)	EC ₅₀ (мкг/мл)
Генотип I BКV*	5,8 ± 1,8	0,009 ± 0,010
Генотип II BКV	2,8 ± 0,6	0,040 ± 0,025
Генотип III BКV	8,4 ± 3,7	0,093 ± 0,057
Генотип IV BКV*	4,1 ± 1,3	0,021 ± 0,020
* Серотипы BКV I и IV составляют примерно 95% от мировой распространенности серотипов. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение по повторностям (n = 4 для KD; n = 3 для EC ₅₀).		

Не наблюдали никакой цитотоксичности вплоть до наибольшей исследованной концентрации (500 мкг/мл). MAU868 также эффективно нейтрализовывало варианты BКV, сконструированные таким образом, что они содержали последовательности VP1 из клинических изолятов или широко распространенные полиморфизмы VP1, а также вирус JC, родственный полиомавирус. После серийного пассажа BКV в присутствии MAU868 не было выявлено ни одного RAV вплоть до 182 суток. В кристаллической структуре MAU868 в комплексе с пентамером VP1 при разрешении 2,66 Å (0,266 нм) был идентифицирован конформационный эпитоп, содержащий 3 контактирующих остатка в VP1 (Y169, R170, K172), которые являются строго консервативными для изолятов BКV и обуславливают широкий спектр активности MAU868 и его высокий барьер резистентности. Варианты BКV с двойными или тройными заменами на аланин в остатках Y169, R170 или K172 были нежизнеспособными.

Мощная противовирусная активность широкого спектра в сочетании с высоким барьером резистентности *in vitro* демонстрирует потенциал MAU868 в качестве наилучшего в своем классе терапевтического агента для лечения или предупреждения ассоциированных с BКV заболеваний.

ПРИМЕР 2

ИССЛЕДОВАНИЕ MAU868 НА ЛЮДЯХ

Рандомизированное, слепое, плацебо-контролируемое исследование с однократной нарастающей дозой было проведено в одном центре в Соединенных Штатах. Участники исследования, исследователи и спонсор были скрыты. MAU868

вводили внутривенно (в/в) (1, 3, 10, 30 и 100 мг/кг) или подкожно (п/к) (3 мг/кг) здоровым взрослым по схеме для рандомизированного, плацебо-контролируемого, слепого исследования с однократной нарастающей дозой. Каждая когорта, получавшая в/в введение, состояла из 5 субъектов (4 MAU868:1 плацебо); когорта, получавшая п/к введение, состояла из 8 субъектов (6 MAU868:2 плацебо). Субъекты находились под наблюдением в течение 24 часов и далее в течение 106 суток с обычным мониторингом безопасности и оценкой фармакокинетических (ФК) параметров.

Концентрации MAU868 в сыворотке определяли посредством валидированного анализа на основе ELISA типа «сэндвич» с использованием колориметрической детекции. Данные по зависимости концентрации MAU868 в плазме от времени подвергали анализу стандартными некомпартментными методами с использованием программного обеспечения WinNonlin для получения типичных параметров экспозиции (AUC, C_{max}, T_{max}, период полувыведения). Пропорциональность дозе исследовали путем регрессии логарифмически преобразованных C_{max} и AUC против логарифмически преобразованной дозы.

Нейтрализующую активность сыворотки *ex vivo* определяли до введения дозы и через 4 недели после введения с использованием первичных клеток эпителия проксимальных почечных канальцев (RPTE), которые выращивали и поддерживали в среде для клеток RPTE.

Тридцать три (33) субъекта полностью прошли исследование. Нежелательные явления были легкими и нечастыми; те явления, которые наблюдали у более чем одного субъекта, включали заложенность носа (3, 9,1%), боль в ротоглотке (3, 9,1%) и кровоизлияние в месте инъекции (кровоподтек после п/к инъекции; 2, 6,1%). Инфузионные реакции отсутствовали. Ни один субъект не прекратил участие в исследовании из-за нежелательного явления или выработки антител против лекарственного средства.

Иллюстративные ФК характеристики представлены на **фигуре 1** и в **таблице E2** ниже.

Таблица E2. Краткие данные по экспозиции MAU868 <i>in vivo</i> по группам лечения						
Параметр	1 мг/кг в/в (n = 4)	3 мг/кг в/в (n = 4)	10 мг/кг в/в (n = 4)	30 мг/кг в/в (n = 4)	100 мг/кг в/в (n = 4)	3 мг/кг п/к (n = 6)
C_{max} (мкг/мл)	24,7 ± 2,77	105 ± 7,92	316 ± 14,2	791 ± 271	2740 ± 353	20,1 ± 4,94 ^s

AUC_{last}[*] (мкг*ч/мл)	9880 ± 2680	39500 ± 8310	115000 ± 13600	332000 ± 47400	1060000 ± 38400	22700 ± 6330
t_{1/2} (сутки)	30,4 ± 11,4	24,8 ± 5,21	22,9 ± 1,80	26,1 ± 3,68	24,7 ± 8,54	30,0 ± 7,25
C_{trough}[^] (мкг/мл)	4,94 ± 1,35	19,4 ± 5,02	59,9 ± 11,0	171 ± 127	510 ± 146	136 ± 367

Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

[§]C_{max} после подкожного введения была достигнута между 7 и 14 сутками после введения дозы.

*AUC_{last} = площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени до последней поддающейся определению концентрации у каждого отдельного участника исследования. AUC_{last} в группах лечения составляла 90% и более от расчетного значения AUC_{inf}, что позволяет предположить, что период отбора образцов в процессе исследования был достаточным для того, чтобы охарактеризовать продолжительность экспозиции MAU868 после обоих путей введения.

[^]C_{trough} = концентрации в сыворотке, определенные на 29 суток (при условии использования способа с введением каждые 4 недели).

ФК для MAU868 включала период полувыведения от 23 до 30 суток. AUC и C_{max} были пропорциональны дозе и находились в диапазонах от 9880 до 1060000 мкг*ч/мл и от 24,7 до 2740 мкг/мл, при этом не было свидетельства насыщения FcRn. Концентрации MAU868 в плазме на 29 суток, скорректированные с учетом внесосудистого распределения для оценки паренхимальной экспозиции, были примерно в 7-751 раз выше, чем наибольшая EC₅₀ *in vitro* (0,093 мкг/мл). После в/в введения среднее значение клиренса MAU868 находилось в диапазоне от 0,0760 до 0,0996 мл/сутки/кг; средний объем распределения находился в диапазоне от 49,8 до 81,9 мл/кг. Для обоих путей введения коэффициенты вариации для AUC и C_{max} составляли ≤28% и ≤34% соответственно. Биодоступность после п/к инъекции составляла 57,6%. Максимальная нейтрализующая активность сыворотки *ex vivo* была достигнута при дозах более 10 мг/кг (см. **фигуру 2**) и оказалась оптимальной в диапазоне доз 10-30 мг/кг.

MAU868 было безопасным и хорошо переносилось. ФК данные являются обоснованием для режима дозирования для поддержания оптимальных концентраций MAU898 в сыворотке/ткани, например, путем мониторинга и определения минимальной C_{trough}, а нейтрализующая активность *ex vivo* позволяет предположить, где может

находиться оптимальный терапевтический диапазон для лечения или предупреждения вызванного ВКV заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Режим дозирования для лечения полиомавирусной инфекции ВК или JC (Джона Каннингема) у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий

(а) парентеральное введение указанному субъекту дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса;

(б) определение в сыворотке или ткани субъекта концентрации указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(в) введение дополнительной дозы указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до того, как минимальная концентрация в сыворотке или ткани (C_{trough}) снизится до менее чем примерно 3-860 мкг/мл;

где указанный режим дозирования обеспечивает поддержание в сыворотке или ткани концентрации указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента выше C_{trough} в течение всего периода лечения.

2. Режим дозирования по п. 1, где:

(1) C_{trough} на стадии (в) соответствует значению в плазме, и указанный режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в плазме снизится до менее чем примерно 150-860 мкг/мл;

(2) C_{trough} на стадии (в) соответствует значению в почечной ткани, и указанный режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в почечной ткани снизится до менее чем примерно 23,5-120 мкг/мл; или

(3) C_{trough} на стадии (в) соответствует значению в ткани мочевого пузыря, и указанный режим дозирования включает введение дополнительной дозы до того, как C_{trough} в ткани мочевого пузыря снизится до менее чем примерно 3-10 мкг/мл.

3. Режим дозирования по п. 1 или п. 2, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) V_HCDR1 , V_HCDR2 и V_HCDR3 , представленные в SEQ ID NO: 6-8, соответственно; и

вариабельную область легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности V_LCDR1 , V_LCDR2 и V_LCDR3 , представленные в SEQ ID NO: 9-11, соответственно, и их варианты, которые специфично связываются с белком VP1.

4. Режим дозирования по п. 3, где

область V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 12, возможно, где последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях, возможно выбранных из одного или более из V5Q, G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q; и

область V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 13, возможно, где последовательность V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях.

5. Режим дозирования по п. 2 или п. 3, где область V_H содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 12, и область V_L содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 13.

6. Режим дозирования по любому из пп. 1-5, включающий идентификацию генотипа вируса ВК или вируса JC у субъекта.

7. Режим дозирования по любому из пп. 1-6, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный из одного или более из генотипов I, II, III и IV, или указанная полиомавирусная инфекция включает вирус JC.

8. Режим дозирования по любому из пп. 1-7, где указанный субъект находится в состоянии иммунной недостаточности.

9. Режим дозирования по любому из пп. 1-8, где указанный субъект должен быть подвергнут, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, возможно, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток.

10. Режим дозирования по п. 9, где указанная процедура трансплантации выбрана из трансплантации почки и трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ).

11. Режим дозирования по любому из пп. 1-10, где указанный субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии.

12. Режим дозирования по любому из пп. 1-11, где указанная доза на стадии (а) составляет от примерно 1 до примерно 100 мг/кг, или примерно 10-30 мг/кг, или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг, возможно, где указанную дозу вводят внутривенно или подкожно.

13. Режим дозирования по любому из пп. 1-12, где указанная дополнительная доза на стадии (в) является такой же, как и доза на стадии (а), или отлична от нее и

возможно составляет от примерно 1 до примерно 100 мг/кг, или примерно 10-30 мг/кг, или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг, возможно, где указанную дозу вводят внутривенно или подкожно.

14. Режим дозирования по любому из пп. 1-13, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа I, и где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 2618 до примерно 3775 до примерно 13061 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 500 до примерно 692 до примерно 1000 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,009 \pm 0,010$ мкг/мл.

15. Режим дозирования по любому из пп. 1-13, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа II, и где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 589 до примерно 849 до примерно 2942 раз (например, в примерно 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 100 до примерно 156 до примерно 200 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,040 \pm 0,025$ мкг/мл.

16. Режим дозирования по любому из пп. 1-13, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа III, и где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 253 до примерно 365 до примерно 1265 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 50 до примерно 67 до примерно 100 раз (например, в примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз) превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,

где EC_{50} составляет примерно $0,093 \pm 0,057$ мкг/мл.

17. Режим дозирования по любому из пп. 1-13, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК генотипа IV, и где:

концентрация в ткани, возможно концентрация в почечной ткани, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 1122 до примерно 1618 до примерно 5604 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

концентрация в ткани, возможно концентрация в ткани мочевого пузыря, при C_{trough} находится в диапазоне значений, которые в от примерно 100 до примерно 297 до примерно 500 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,021 \pm 0,020$ мкг/мл.

18. Режим дозирования по любому из пп. 1-13, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус JC, и концентрация в ткани при C_{trough} представляет собой значения, которые в по меньшей мере от примерно 29 до примерно 110 до примерно 158 до примерно 547 раз превышают EC_{50} антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где EC_{50} составляет примерно $0,215 \pm 0,130$ мкг/мл.

19. Режим дозирования по любому из пп. 1-18, где промежуток времени между указанными стадиями (а) и (б) составляет примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или 1, 2 или 3 месяца.

20. Режим дозирования по любому из пп. 1-19, включающий (б) определение содержания в сыворотке или ткани субъекта примерно один раз каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или примерно 1-3 раза каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или примерно 1-6 раз каждые 1, 2 или 3 месяца.

21. Режим дозирования по любому из пп. 1-20, где промежуток времени между указанными стадиями (а) и (в) составляет примерно, по меньшей мере примерно или не более чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или 1, 2 или 3 месяца.

22. Режим дозирования по любому из пп. 1-21, где по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% или более от концентрации циркулирующего в сыворотке указанного антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента проникает в инфицированный орган.

23. Режим дозирования по п. 22, где указанный инфицированный орган представляет собой мочевой пузырь, или почку, или центральную нервную систему (ЦНС).

24. Режим дозирования по любому из пп. 1-23, где среднее значение клиренса указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 0,0760-0,0996 мл/сутки/кг.

25. Режим дозирования по любому из пп. 1-24, где средний объем распределения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 49,8-81,9 мл/кг.

26. Способ лечения полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий парентеральное введение указанному субъекту дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком VP1 полиомавируса, где доза составляет примерно 10-30 мг/кг, или примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг.

27. Способ по п. 26, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR), V_H CDR1, V_H CDR2 и V_H CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6-8, соответственно; и

вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности V_L CDR1, V_L CDR2 и V_L CDR3, представленные в SEQ ID NO: 9-11, соответственно,

и их варианты, которые специфично связываются с белком VP1.

28. Способ по п. 27, где

область V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 12, возможно, где, последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях, возможно выбранных из одного или более из V5Q, G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q; и

область V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 13, возможно, где, последовательность V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях.

29. Способ по п. 27 или п. 28, где область V_H содержит, состоит из или состоит

по существу из SEQ ID NO: 12, и область V_L содержит, состоит из или состоит по существу из SEQ ID NO: 13.

30. Способ по любому из пп. 26-29, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный из одного или более из генотипов I, II, III и IV.

31. Способ по любому из пп. 26-30, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус JC.

32. Способ по любому из пп. 26-31, где указанный субъект находится в состоянии иммунной недостаточности.

33. Способ по любому из пп. 26-32, где указанный субъект близок к тому, чтобы быть подвергнутым, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, возможно, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток.

34. Способ по п. 33, где указанная процедура трансплантации выбрана из трансплантации почки и трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ).

35. Способ по любому из пп. 26-34, где указанный субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии.

36. Способ по любому из пп. 26-35, где по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% или более от концентрации циркулирующего в сыворотке указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента проникает в инфицированный орган.

37. Способ по п. 36, где указанный инфицированный орган представляет собой мочевой пузырь или почку.

38. Способ по любому из пп. 26-37, где среднее значение клиренса указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 0,0760-0,0996 мл/сутки/кг.

39. Способ по любому из пп. 26-38, где средний объем распределения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 49,8-81,9 мл/кг.

40. Режим дозирования или способ лечения по любому из пп. 1-39, где доза 10-30 мг/кг обеспечивает оптимальную нейтрализующую активность (IC₅₀) в сыворотке субъекта в отношении полиомавируса ВК или JC, определяемую в анализе содержания

вируса *in vitro* или *ex vivo*.

41. Режим дозирования или способ лечения по любому из пп. 1-40, который обеспечивает уменьшение виремии и/или вирурии ВК или JC у субъекта, возможно на примерно или по меньшей мере примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 2000%, 3000%, 4000% или 5000% или более, по сравнению с контролем или состоянием до лечения с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

42. Режим дозирования или способ лечения по любому из пп. 1-41, который обеспечивает уменьшение или облегчение у субъекта одного или более симптомов, ассоциированных с вирусом ВК или JC, возможно одного или более симптомов, выбранных из нарушения четкости зрения или других изменений зрения, мочи коричневого или красного цвета, боли при мочеиспускании, снижения функции почек, затрудненного мочеиспускания, кашля, простуды, затрудненного дыхания, лихорадки, мышечной боли, мышечной слабости и/или судорог, возможно сужения мочеточников или воспаления почек, такого как интерстициальный нефрит.

43. Режим дозирования или способ лечения по любому из пп. 1-42, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции, которая содержит гистидин, сахарид, возможно сахарозу, и полиол, возможно полисорбат.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, приготовленные в виде состава для парентерального введения в дозе примерно 10-30 мг/кг и содержащие вариабельную область тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR), V_H CDR1, V_H CDR2 и V_H CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6-8, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности V_L CDR1, V_L CDR2 и V_L CDR3, представленные в SEQ ID NO: 9-11, соответственно; и

фармацевтически приемлемый носитель, содержащий гистидин, сахарид, возможно сахарозу, и полиол, возможно полисорбат.

45. Фармацевтическая композиция по п. 44, где область V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 12, возможно, где, последовательность V_H имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях, возможно выбранных из одного или более из V5Q,

G9P, T10G, N30S, N30K и N30Q; и

область V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 13, возможно, где, последовательность V_L имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 изменений в каркасных областях.

46. Фармацевтическая композиция по п. 44 или п. 45, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент приготовлены в виде состава для парентерального введения в дозе примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/кг.

47. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 44-46, которая приготовлена в виде состава для внутривенного введения.

48. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 44-46, которая приготовлена в виде состава для подкожного введения.

49. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 44-48 для применения в лечении полиомавирусной инфекции ВК или JC у нуждающегося в этом субъекта-человека.

50. Фармацевтическая композиция для применения по п. 49, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус ВК, выбранный из одного или более из генотипов I, II, III и IV.

51. Фармацевтическая композиция для применения по п. 49 или п. 50, где указанная полиомавирусная инфекция включает вирус JC.

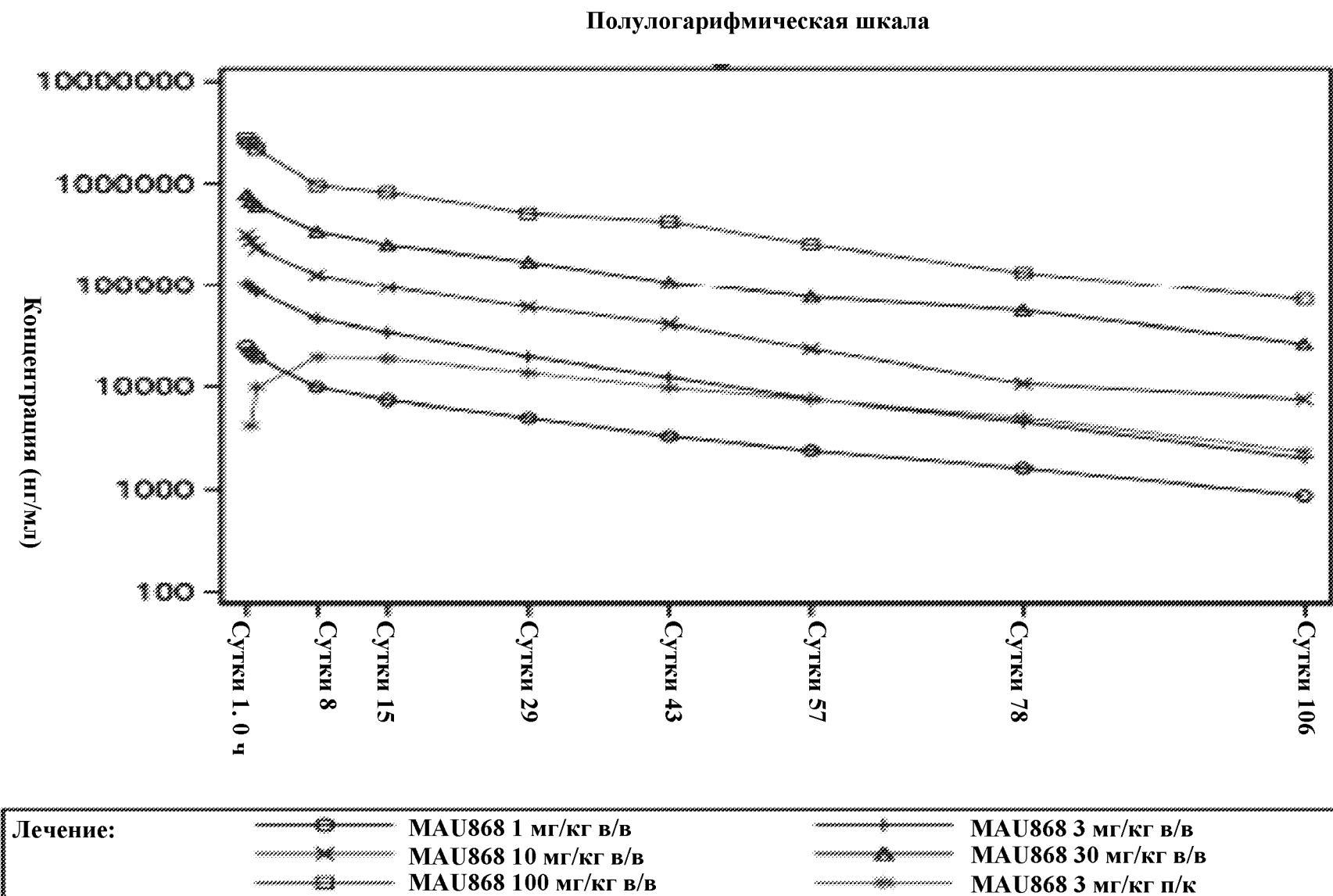
52. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 49-51, где указанный субъект находится в состоянии иммунной недостаточности.

53. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 49-52, где указанный субъект близок к тому, чтобы быть подвергнутым, подвергается или был подвергнут процедуре трансплантации, возможно, процедуре трансплантации органа или трансплантации с использованием клеток.

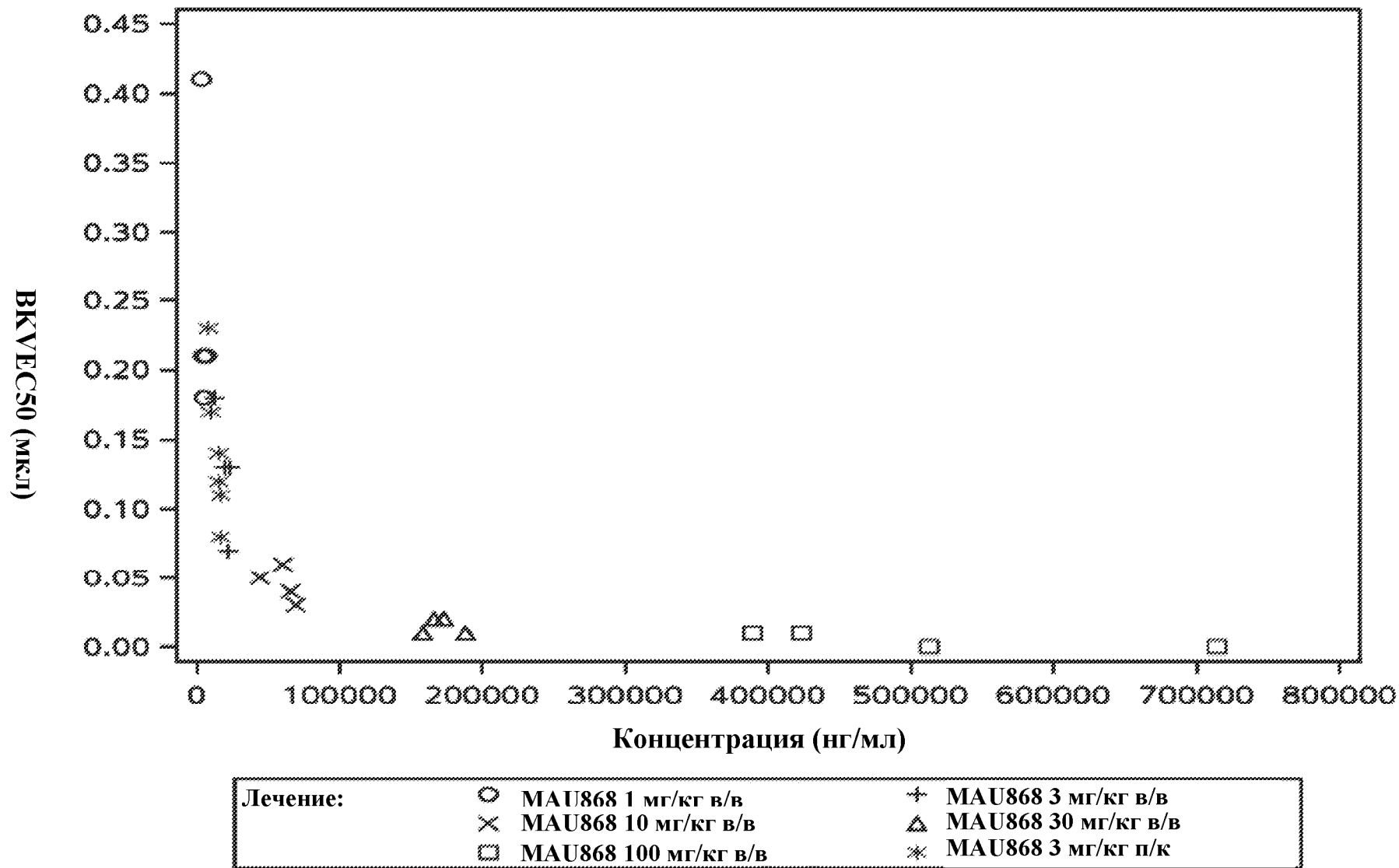
54. Фармацевтическая композиция для применения по п. 53, где указанная процедура трансплантации выбрана из трансплантации почки и трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ).

55. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 49-54, где указанный субъект имеет или подвержен риску наличия состояния, выбранного из ассоциированной с вирусом ВК нефропатии, ассоциированного с вирусом ВК геморрагического цистита и ассоциированной с вирусом JC прогрессирующей

многоочаговой лейкоэнцефалопатии.



ФИГ. 1



ФИГ. 2