

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190530** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.06.21

(22) Дата подачи заявки
2019.09.11

(51) Int. Cl. *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К CD200R И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/731,204

(32) 2018.09.14

(33) US

(86) PCT/US2019/050511

(87) WO 2020/055943 2020.03.19

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Демарест Стивен Джон, Кёстер Аня,
Мехта Паял, Поттер Скотт Чарльз,
Руиз Диана Исабель, Уитчер Деррик
Райан, У Сюфэн (US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Строкова О.В.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к агонистическим антителам к CD200R человека и их применению для лечения таких заболеваний, как атопический дерматит, хроническая спонтанная крапивница, аллергия, астма, склеродермия, синдром раздраженного кишечника (IBD), системная красная волчанка (SLE), рассеянный склероз (MS), ревматоидный артрит (RA), болезнь "трансплантат против хозяина" (GvHD) или псориаз.

A1

202190530

202190530

A1

АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К CD200R И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, настоящее изобретение относится к агонистическим антителам, направленным на рецептор CD200 (CD200R), композициям, содержащим такие агонистические антитела к CD200R, и способам применения таких агонистических антител к CD200R для лечения нарушений, таких как аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, астма или другие воспалительные заболевания.

Пути иммунных контрольных точек могут модулировать как аутоиммунный ответ, так и противораковый иммунный ответ. В терапии аутоиммунных заболеваний желательно стимулировать, *то есть* агонизировать, активность иммуноингибирующего пути так, чтобы подавлять иммунный ответ. И наоборот, в терапии рака желательно ингибировать, *то есть* антагонизировать, активность иммуноингибирующего пути так, чтобы вновь активировать (стимулировать) иммунный ответ.

CD200R является членом суперсемейства Ig и частью семейства рецепторов контрольных точек, которые отрицательно регулируют активацию иммунных клеток. Активация пути CD200R приводит к снижению клеточной функции, такому как снижение клеточной пролиферации и ингибирование воспалительных цитокинов. CD200R главным образом экспрессируется на поверхности клеток врожденной системы, в частности, моноцитарной линии, такой как макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки, а также на активированных субпопуляциях Т-клеток, таких как Т-клетки памяти. Природным лигандом для CD200R является CD200, который более широко экспрессируется на множестве типов клеток, включая лимфоциты. Мыши с нокаутом CD200R и CD200 имеют нормальный фенотип, но более предрасположены к индуцированному аутоиммунному заболеванию (см., *например*, Simelyte et al., Clin Exp Immunol. 162: 163-8 (2010)). Напротив, сверхэкспрессия CD200 у мышей обеспечивает устойчивость к аллогенной трансплантации и DSS-индуцированному колиту (Chen et al., PLoS One. 2016;11(2):e0146681. doi:10.1371/journal.pone.0146681).

Следовательно, увеличение CD200R-опосредованной передачи сигнала представляет собой потенциальный подход к лечению аутоиммунных нарушений, что может привести к глубокой модификации заболевания и длительности ответа, а также к основным преимуществам безопасности по сравнению с современными иммуномодулирующими препаратами. Например, CD200R высоко экспрессируется в дифференцированных тканевых резидентных клетках, таких как макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки и врожденные лимфоидные клетки. Эти типы клеток вносят

вклад в патологию таких заболеваний, как атопический дерматит, и поэтому агонистические антитела к CD200R могут ослаблять активность этих клеток при таких заболеваниях, как атопический дерматит.

В этой области есть трудности с доставкой терапевтически эффективных и безопасных агонистических антител к CD200R. Полагают, что эта трудность, по меньшей мере отчасти, является следствием сложных клеточных взаимодействий, необходимых для достижения агонизма CD200R с минимальными проблемами по безопасности (*например*, без индукции высвобождения цитокинов) в физиологических условиях.

Патент США 8212008 раскрывает антитела к CD200R, такие как Dх182. Dх182 представляет собой гуманизованное антитело IgG1, которое агонизирует CD200R и блокирует связывание CD200 с CD200R. Однако Dх182 также связывается и активирует CD200RLа яванского макака (активирующая форма яванского макака), экспрессируемый в тучных клетках мышей, и тем самым индуцирует реакцию дегрануляции тучных клеток в этих клетках через CD200RLа яванского макака. WO 2015/057906 также раскрывает агонистические антитела к CD200R, такие как H2RM147. H2RM147, вероятно, конкурирует с CD200 человека за связывание с CD200R1 человека.

Таким образом, существует потребность в альтернативных антителах к CD200R, которые 1) связывают CD200R человека с желаемой скоростью ассоциации и диссоциации для оптимальной агонистической активности, 2) агонизируют CD200R человека для достижения иммуносупрессивного ответа и эффективности *in vivo*, 3) демонстрируют достаточную эффективность в качестве монотерапии для лечения и/или предотвращения таких нарушений, как аутоиммунные заболевания, аллергическое заболевание, астма или другие воспалительные заболевания, 4) не вызывают значительного высвобождения цитокинов, 5) не блокируют связывание CD200 человека и CD200R человека, 6) не связывают CD200RLа или связывает CD200RLа с низкой аффинностью и/или 7) демонстрируют низкую иммуногенность (т.е. достаточно неиммуногенны у яванских макаков и/или людей) и стабильность, физическую и химическую стабильность *in vivo*, включая, помимо прочего, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, которые приемлемы для разработки и/или применения в лечении аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы или других воспалительных заболеваний.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает новые агонистические антитела к CD200R человека. Антитела по настоящему изобретению особенно предпочтительны по сравнению с агонистическими антителами к CD200R уровня техники

с точки зрения по меньшей мере следующих свойств: 1) желаемые скорости ассоциации и диссоциации, 2) агонизм CD200R человека для достижения иммуносупрессивного ответа и эффективности *in vivo*, 3) достаточная эффективность в качестве монотерапии для лечения и/или предотвращения аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы или других воспалительных заболеваний, 4) отсутствие значительного высвобождения цитокинов, 5) отсутствие блокирования связывания CD200 человека с CD200R человека и связывания с другим эпитопом по сравнению с антителами уровня техники, 6) отсутствие связывания или связывание с низкой аффинностью CD200RLa яванского макака по сравнению со связыванием с CD200R человека, и/или 7) низкая иммуногенность (т.е. достаточно неиммуногенны у яванских макаков и/или людей) и стабильность, физическая и химическая стабильность *in vivo*, включая, помимо прочего, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, которые приемлемы для разработки и/или применения в лечении аутоиммунных нарушений, аллергического заболевания, астмы или других воспалительных заболеваний.

Настоящее изобретение обеспечивает преимущество по сравнению с уровнем техники путем предоставления композиций и способов, подходящих для предотвращения, подавления или ослабления аутоиммунных и/или связанных с иммунной толерантностью нарушений, аллергического заболевания, астмы или других воспалительных заболеваний путем стимуляции иммунных контрольных точек с применением специально сконструированного агонистического антитела к CD200R человека. Агонистические антитела к CD200R человека по данному изобретению способны ослаблять иммунную патологию или восстанавливать иммунный гомеостаз, предпочтительно, путем ингибирования врожденного звена иммунного ответа, отмены антигенспецифического иммунного процесса и, таким образом, непосредственно устранять патологию, лежащую в основе заболевания. Клиническое применение таких антител может привести к длительной устойчивости к заболеванию (заболеваниям), которое лечат.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает антитело, которое связывает CD200R человека (SEQ ID NO: 15), содержащее переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR), где указанная HCVR содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где аминокислотная последовательность HCDR1 представлена SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 представлена SEQ ID NO: 2 и аминокислотная последовательность HCDR3 представлена SEQ ID NO: 3, аминокислотная

последовательность LCDR1 представлена SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность LCDR2 представлена SEQ ID NO: 5 и аминокислотная последовательность LCDR3 представлена SEQ ID NO: 6.

В одном из вариантов реализации данного изобретения предложено антитело, которое связывает CD200R человека, содержащее HCVR и LCVR, где аминокислотная последовательность HCVR представлена SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность LCVR представлена SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 7 представляет собой глутамин. В других вариантах реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 7 представляет собой пироглутаминовую кислоту.

В одном из вариантов реализации данного изобретения предложено антитело, которое связывает CD200R человека, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), где аминокислотная последовательность HC представлена SEQ ID NO: 9 и аминокислотная последовательность LC представлена SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глутамин. В других вариантах реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой пироглутаминовую кислоту. В некоторых вариантах реализации Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глицин. В некоторых вариантах реализации Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 отсутствует. В конкретном варианте реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глутамин, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глицин. В другом конкретном варианте реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой пироглутаминовую кислоту, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глицин. В конкретном варианте реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глутамин, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 отсутствует. В другом конкретном варианте реализации Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой пироглутаминовую кислоту, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 отсутствует.

В одном из вариантов реализации антитело по настоящему изобретению не вызывает значительного высвобождения цитокинов. В другом варианте реализации антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R. В предпочтительном варианте реализации антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов, и антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R. В некоторых таких вариантах реализации антитело представляет собой подтип IgG4, предпочтительно IgG4P. В другом варианте реализации антитело связывает CD200R человека и яванского макака.

В данном изобретении также предложена клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело к CD200R человека, содержащее: 1) HCVR, содержащую HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, содержащую LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело к CD200R человека, содержащее: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело к CD200R человека, содержащее: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено антитело к CD200R человека, состоящее из двух тяжелых цепей, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В одном из вариантов реализации антитело по настоящему изобретению не вызывает значительного высвобождения цитокинов. В другом варианте реализации антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R. В предпочтительном варианте реализации антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов, и антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R. В некоторых таких вариантах реализации антитело представляет собой подтип IgG4, предпочтительно IgG4P. В другом варианте реализации антитело связывает CD200R человека и яванского макака.

В данном изобретении также предложен способ получения антитела к CD200R человека, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело содержит: 1) HCVR, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и b) выделение антитела. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен способ получения антитела к CD200R, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело содержит:

- 5 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и b) выделение антитела.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен способ получения антитела к CD200R человека, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело содержит:

- 10 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и b) выделение антитела. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен способ получения антитела к CD200R человека, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и b) выделение антитела.

В одном из вариантов реализации антитело по настоящему изобретению не вызывает значительного высвобождения цитокинов. В другом варианте реализации антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R. В предпочтительном варианте реализации антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов, и антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R. В некоторых таких вариантах реализации антитело представляет собой подтип IgG4, предпочтительно IgG4P. В другом варианте реализации антитело связывает CD200R человека и яванского макака.

- 25 В данном изобретении также предложено антитело к CD200R человека, полученное вышеуказанными способами. В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD200R, полученное вышеуказанными способами, и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

- 30 В данном изобретении также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 12. В данном изобретении также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 13. В данном изобретении также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 12 и SEQ ID

NO: 13. В данном изобретении также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий HC антитела, аминокислотная последовательность которой представляет собой последовательность SEQ ID NO: 9. В одном из вариантов реализации указанная молекула ДНК, кодирующая HC антитела, представлена SEQ ID NO: 12. В
5 данном изобретении также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий LC антитела, аминокислотная последовательность которой представляет собой последовательность SEQ ID NO: 10. В одном из вариантов реализации молекула ДНК, кодирующая LC антитела, представлена SEQ ID NO: 13.

В данном изобретении также предложена клетка млекопитающего, содержащая
10 молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 12. В данном изобретении также предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 13. В данном изобретении также предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO:
15 12 и SEQ ID NO: 13.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело по данному изобретению.

В данном изобретении также предложен способ лечения пациента, имеющего заболевание, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, астму или другие воспалительные заболевания, включающий
20 введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению.

В данном изобретении также предложено антитело согласно данному изобретению для применения в терапии.

В данном изобретении также предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, астму или другие воспалительные
25 заболевания.

В данном изобретении также предложено применение антитела по настоящему
30 изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, астму или другие воспалительные заболевания.

В одном из вариантов реализации указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В другом варианте реализации заболевание представляет

собой аллергическое заболевание. В другом варианте реализации заболевание представляет собой астму. В некоторых вариантах реализации заболевание представляет собой хроническую идиопатическую крапивницу (также называемую здесь хронической спонтанной крапивницей (CSU)), целиакию (включая, помимо прочего, рефрактерную целиакию типа II), аллергию, хроническое аллергическое заболевание, пищевую аллергию, эозинофильный эзофагит, синдром активации макрофагов (MAS), астму, склеродермию, пузырчатку, заболевание синдром раздраженного кишечника (IBD), системную красную волчанку (SLE), рассеянный склероз (MS), ревматоидный артрит (RA), болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD), псориаз, мастоцитоз, воспалительное заболевание кожи или атопический дерматит. В других вариантах реализации заболевание представляет собой аллергический контактный дерматит, сезонную аллергию, лечение и предотвращение анафилаксии, буллезный пемфигоид и другие аутоиммунные заболевания, вызывающие образование пузырей, аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит, первичный билиарный цирроз, идиопатический легочный фиброз, миастению гравис, васкулит и миозит. В конкретном варианте реализации хроническое аллергическое заболевание представляет собой септическую лихорадку или аллергический ринит. В предпочтительном варианте реализации заболевание представляет собой атопический дерматит.

В данном изобретении предложено антитело, которое связывает CD200R человека, при этом указанное антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R и указанное антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов. В одном из вариантов реализации антитело демонстрирует агонизм CD200R и отсутствие значительного высвобождения цитокинов, подобное агонизму CD200R и отсутствию значительного высвобождения цитокинов, продемонстрированному антителом I-4P. В одном из вариантов реализации агонистическое антитело к CD200R не вызывает значительного высвобождения цитокинов по сравнению с антителом IgG1 дикого типа (отсутствие мутаций в Fc-части) (которое действительно вызывает значительное высвобождение цитокинов, особенно высвобождение IFN- γ). В конкретном варианте реализации данного изобретения предложено агонистическое антитело к CD200R, отличающееся тем, что указанное антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов по сравнению с антителом IgG1 дикого типа, содержащим такие же CDR, что и агонистическое антитело к CD200R. В одном из вариантов реализации значительное высвобождение цитокинов детектируют путем сравнения количества цитокинов, присутствующих в образцах крови, инкубированных с антителом, и количества

цитокинов, присутствующих в образцах крови без инкубации с антителом, и определения наличия значительного высвобождения цитокинов, если количество цитокинов, присутствующих в образце крови, инкубированном с антителом, по меньшей мере в три раза превышает количество цитокинов, присутствующих в образце крови без антитела.

5 В одном из вариантов реализации антитело содержит HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где аминокислотная последовательность HCDR1 представлена SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 представлена SEQ ID NO: 2 и аминокислотная последовательность HCDR3 представлена SEQ ID NO: 3, аминокислотная
10 последовательность LCDR1 представлена SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность LCDR2 представлена SEQ ID NO: 5 и аминокислотная последовательность LCDR3 представлена SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов реализации антитело содержит LCVR и HCVR, при этом аминокислотная последовательность HCVR представлена SEQ ID NO: 7 и аминокислотная
15 последовательность LCVR представлена SEQ ID NO: 8.

В данном изобретении предложено антитело по настоящему изобретению, которое связывает по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или все из Fc γ RI, Fc γ RIIA_{131H}, Fc γ RIIA_{131R}, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIA_{158V}.

20 В одном из вариантов реализации антитело связывает Fc γ RI с аффинностью связывания от примерно 70 пМ до примерно 500 пМ. В другом варианте реализации антитело связывает Fc γ RIIA_{131H} с аффинностью связывания от примерно 2 мкМ до примерно 5 мкМ. В другом варианте реализации антитело связывает Fc γ RIIA_{131R} с аффинностью связывания от примерно 1 мкМ до примерно 5 мкМ. В другом варианте
25 реализации антитело связывает Fc γ RIIb с аффинностью связывания от примерно 1 мкМ до примерно 4 мкМ. В другом варианте реализации антитело связывает Fc γ RIIIA_{158V} с аффинностью связывания от примерно 1 мкМ до примерно 6 мкМ. В другом варианте реализации антитело также связывает Fc γ RIIIA_{158F} с аффинностью связывания более 9 мкМ.

30 В одном из вариантов реализации значения аффинности связывания антитела в отношении рецептора составляют от примерно 70 пМ до примерно 500 пМ в отношении Fc γ RI, от примерно 2 мкМ до примерно 5 мкМ в отношении Fc γ RIIA_{131H}, от примерно 1 мкМ до примерно 5 мкМ в отношении Fc γ RIIA_{131R}, от примерно 1 мкМ до примерно 4 мкМ в отношении Fc γ RIIb, от примерно 1 мкМ до примерно 6 мкМ в отношении Fc γ

RPIA_158V и более 9 мкМ в отношении Fcγ RPIA_158F. В более конкретном варианте реализации значения аффинности связывания антитела в отношении рецептора составляют примерно 400 пМ в отношении Fcγ RI, примерно 4 мкМ в отношении Fcγ RPIA_131H, примерно 2 мкМ в отношении Fcγ RPIA_131R, примерно 2 мкМ в отношении Fcγ RPIb, примерно 4 мкМ в отношении Fcγ RPIA_158V и более 10 мкМ в отношении Fcγ RPIA_158F. В другом варианте реализации антитело не связывает C1q. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В других вариантах реализации связывание с C1q определяют путем ELISA.

10 В данном контексте «CD200R» относится к рецептору CD200. В данном контексте «hCD200R» или «CD200R человека» относится к CD200R человека дикого типа и, предпочтительно, к CD200R человека дикого типа, аминокислотная последовательность которого указана в SEQ ID NO: 15.

15 Термины «супо», «яванский макак» или «обезьяна яванский макак» применяются в данном документе взаимозаменяемо. При применении в отношении полипептида CD200R, если не указано иное, подразумевается, что указанные термины относятся к CD200R обезьяны яванский макак дикого типа и, предпочтительно, к CD200R обезьяны яванский макак дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. Термины «CD200RLa» или «активирующая форма»
20 относятся к CD200R яванского макака, аминокислотная последовательность которого указана в SEQ ID NO: 17. CD200RLa является близким гомологом CD200R человека, но с противоположной (активирующей) активностью. Следовательно, предпочтительное агонистическое антитело к CD200R связывает CD200RLa со значительно сниженной аффинностью по сравнению со связыванием антитела с CD200R.

25 В контексте настоящего описания «агонистическое антитело к человеческому CD200R» или «агонистическое антитело к CD200R человека» относится к антителу, которое связывается с CD200R человека и при введении *in vitro* или *in vivo* обеспечивает достижение иммуносупрессивного ответа, например, значительное снижение по меньшей мере одной желаемой активности, такое как желаемое снижение выработки IL-8. В
30 контексте настоящего описания термины «выработка» и «секреция», относящиеся к цитокинам, взаимозаменяемы.

В данном контексте термин «антитело» относится к сконструированному не встречающемуся в природе полипептидному комплексу, имеющему две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), так что тяжелые цепи и легкие цепи связаны дисульфидными

связями, при этом указанное антитело является изотипическим антителом IgG. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из N-концевой LCVR и константной области легкой цепи. При экспрессии в определенных биологических системах антитела гликозилированы в Fc-области. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-области антитела в высококонсервативном участке N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела могут быть также гликозилированы и в других положениях.

Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой антитела IgG1 или IgG4. Предпочтительно, антитела по настоящему изобретению представляют собой антитела IgG4. Антитело IgG4 может содержать мутацию S228P в HC (например, IgG4P), которая, как известно, предотвращает образование полуантитела, характерное для подкласса IgG4 человека.

Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3. CH1 идет после HCVR; CH1 и HCVR образуют часть тяжелой цепи антигенсвязывающего (Fab) фрагмента, который является частью антитела, которая связывает антиген (антигены). CH2 идет после шарнирной области и перед CH3. CH3 идет после CH2 и находится в карбокси-конце тяжелой цепи. Константная область легких цепей содержит один домен, CL. CL идет после LCVR; при этом CL и LCVR образуют часть легкой цепи Fab.

Области HCVR и LCVR антитела по данному изобретению могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность («CDR»), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями («FR»). Каждая LCVR и HCVR состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». Области CDR содержат большинство остатков, которые обеспечивают специфические взаимодействия с антигеном. Определение CDR по Кабату (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)) основано на вариабельности последовательности антител. Определение CDR по Чотиа (Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical

structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)) основано на трехмерных структурах антител и топологиях CDR-петель. Определения CDR по Чотиа идентичны определениям CDR по Кабату, за исключением HCDR1 и HCDR2.

5 Определения CDR по Норсу (North et al., “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)) основано на кластеризации распространения аффинности с большим количеством кристаллических структур. Для целей данного изобретения отнесение аминокислот к доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител по данному изобретению основано на хорошо известном соглашении по нумерации Кабата и соглашении по нумерации Норса. В случае CDR 10 легкой цепи антител по данному изобретению применяются определения CDR по Норсу. В тяжелой цепи как HCDR1, так и HCDR3 также применяются определения по Норсу. В HCDR2 применяется гибрид определений по Норсу и Кабату. Определение по Норсу применяют для идентификации начального N-терминального участка, а определение по Кабату - для определения последнего положения.

15 Настоящее изобретение предполагает, что антитела по настоящему изобретению являются антителами человека или гуманизированными антителами. В контексте моноклональных антител термины «человек» и «гуманизированный» хорошо известны специалистам в данной области техники (Weiner LJ, *J. Immunother.* 2006; 29: 1-9; Mallbris L, et al., *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2016; 9: 13-15).

20 Молекула ДНК согласно данному изобретению представляет собой не встречающуюся в природе молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность одного из полипептидов в антителе согласно данному изобретению (например, тяжелая цепь, легкая цепь, переменная тяжелая цепь и переменная легкая 25 цепь).

Выделенная ДНК, кодирующая область HCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей HCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

30 Выделенная ДНК, кодирующая область LCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей

LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи.

Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной амплификации ПЦР.

- 5 Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда. Предпочтительно для антител по данному изобретению константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа.

Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине после функционального соединения указанных последовательностей с
10 последовательностью контроля экспрессии. Экспрессионные векторы, как правило, пригодны для репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктаза, чтобы обеспечить возможность обнаружения тех клеток, которые
15 трансформированы необходимыми последовательностями ДНК.

Антитела по данному изобретению легко можно получить в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-хозяева культивируют, применяя методики, хорошо известные в данной области техники.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные
20 последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела, и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, которые изменяются в зависимости от типа клетки-хозяина.

Различные способы очистки белка могут применяться для очистки белков, включая
25 антитела, но не ограничиваясь ими, при этом такие способы известны в данной области техники.

Антитело по данному изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить парентеральными путями, неограничивающими
30 примерами которых являются подкожное введение и внутривенное введение. Антитело согласно данному изобретению может быть введено пациенту совместно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами в виде однократной или многократных доз. Фармацевтические композиции по данному изобретению можно приготовить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники (например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd

ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press) и содержат антитело, как раскрыто в данном документе, и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

В данном контексте термин «аутоиммунное заболевание» или «аутоиммунное нарушение» применяется взаимозаменяемо и относится к нежелательным патологическим состояниям, которые возникают в результате нефизиологических или нежелательных иммунных реакций против собственных клеток и/или тканей или трансплантированных клеток и/или тканей. Термин «аутоиммунное заболевание» или «аутоиммунное нарушение» предназначен для включения таких патологических состояний, независимо от того, опосредованы ли они гуморальным или клеточным иммунным ответом. «Аллергия» (или «аллергическое заболевание») представляет собой заболевание, управляемое Т-хелпером 2 (ТН2), которое развивается в основном из-за активности клеток ТН2. Типичные заболевания, которые предполагается лечить антителами по изобретению, описанными в настоящем документе, включают хроническую идиопатическую крапивницу, целиакию (включая, но не ограничиваясь ими, рефрактерную целиакию типа II), аллергию, хроническое аллергическое заболевание (такое как сенная лихорадка или аллергический ринит), пищевую аллергию, эозинофильный эзофагит, MAS, астму, склеродермию, а также пузырчатку, IBD, SLE, MS, RA, GvHD, псориаз, мастоцитоз, воспалительное заболевание кожи и атопический дерматит. В других вариантах реализации заболевание, которое предполагается лечить антителами по изобретению, описанными в настоящем документе, включает аллергический контактный дерматит, сезонные аллергии, лечение и предотвращение анафилаксии, буллезный пемфигоид и другие аутоиммунные заболевания, вызывающие образование пузырей, аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит, первичный билиарный цирроз, идиопатический легочный фиброз, миастению гравис, васкулит и миозит.

Термины «хроническая идиопатическая крапивница» и «хроническая спонтанная крапивница (CSU)» являются взаимозаменяемыми в настоящем описании.

В настоящем описании термин «врожденный иммунитет» включает часть иммунного ответа, которая, в отличие от адаптивной части иммунного ответа, требуется для инициирования и поддержания адаптивного иммунного ответа (ответы антител и Т-клеточные ответы).

Термин «лечение» (или «лечить», или «процесс лечения») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению

вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологии или заболевания.

«Эффективное количество» означает такое количество агонистического антитела к CD200R человека по данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело, которое вызывает биологический или клинический ответ или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, и способности антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективное количество также является таким, при котором любой токсический или вредный эффект антитела перевешивается терапевтически благоприятными эффектами. Такое преимущество включает в себя любой из следующих факторов: повышенную иммунную толерантность трансплантированных органов; стабилизированное аутоиммунное заболевание или нарушение; или ослабление признаков или симптомов аутоиммунного нарушения и т. д. Специалист в данной области техники может легко определить эффективное количество, применяя для этого известные методики и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. Эффективное количество агонистического антитела к CD200R человека по настоящему изобретению можно вводить в одной дозе или в нескольких дозах. Кроме того, эффективное количество антитела по изобретению можно вводить в виде нескольких доз в количествах, которые были бы меньше эффективного количества, если бы не вводили более одного раза. При определении эффективного количества для пациентов лечащий врач учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: конституцию пациента (например, вес или массу), площадь поверхности тела, возраст и общее состояние здоровья; конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение; степень или вовлечение в патологический процесс, или тяжесть заболевания или нарушения; ответ конкретного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему лечения; применение сопутствующего препарата и другие значимые обстоятельства, известные врачам. Еженедельная доза, доза каждые две недели, ежемесячная или ежеквартальная доза для парентерального (включая, но не ограничиваясь ими, подкожное, внутримышечное и/или внутривенное) введения может составлять, например, от примерно 50 мг до примерно 500 мг, от примерно 75 мг до примерно 500 мг, от примерно 100 мг до примерно 500 мг, от примерно 125 мг до

примерно 500 мг, от примерно 250 мг до примерно 500 мг, от примерно 300 мг до
примерно 500 мг, от примерно 350 мг до примерно 500 мг, от примерно 400 мг до
примерно 500 мг, от примерно 450 мг до примерно 500 мг, от примерно 50 мг до примерно
400 мг, от примерно 75 мг до примерно 400 мг, от примерно 100 мг до примерно 400 мг,
5 от примерно 125 мг до примерно 400 мг, от примерно 250 мг до примерно 400 мг, от
примерно 300 мг до примерно 400 мг, от примерно 350 мг до примерно 400 мг, от
примерно 50 мг до примерно 300 мг, от примерно 75 мг до примерно 300 мг, от примерно
100 мг до примерно 300 мг, от примерно 125 мг до примерно 300 мг, от примерно 150 мг
до примерно 300 мг, от примерно 175 мг до примерно 300 мг, от примерно 200 мг до
10 примерно 300 мг, от примерно 250 мг до примерно 300 мг, от примерно 50 мг до примерно
250 мг, от примерно 75 мг до примерно 250 мг, от примерно 100 мг до примерно 250 мг,
от примерно 125 мг до примерно 250 мг, от примерно 150 мг до примерно 250 мг, от
примерно 175 мг до примерно 250 мг, от примерно 200 мг до примерно 250 мг, от
примерно 75 мг до примерно 250 мг, от примерно 50 мг до примерно 200 мг, от примерно
15 75 мг до примерно 200 мг, от примерно 100 мг до примерно 200 мг, от примерно 125 мг до
примерно 200 мг, от примерно 150 мг до примерно 200 мг, от примерно 175 мг до
примерно 200 мг, от примерно 50 мг до примерно 175 мг, от примерно 75 мг до примерно
175 мг, от примерно 100 мг до примерно 175 мг, от примерно 125 мг до примерно 175 мг
или от примерно 150 мг до примерно 175 мг. Еженедельная доза, доза каждые две недели,
20 ежемесячная или ежеквартальная доза для парентерального (включая, но не
ограничиваясь ими, подкожное, внутримышечное и/или внутривенное) введения может
составлять от примерно 0,5 мг/кг до примерно 10 мг/кг, примерно от 1 мг/кг до примерно
10 мг/кг, от примерно 2 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 3 мг/кг до примерно 10
мг/кг, от примерно 4 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 5 до примерно 10 мг/кг, от
25 примерно 6 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 7 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от
примерно 8 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от
примерно 2 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от примерно 3 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от
примерно 4 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от примерно 5 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от
примерно 6 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от
30 примерно 2 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от примерно 3 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от
примерно 4 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от примерно 5 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от
примерно 1 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 2 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от
примерно 3 мг кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 4 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от
примерно 1 мг/кг до примерно 4 мг/кг, от примерно 2 мг/кг до примерно 4 мг/кг, от

примерно 3 мг/кг до примерно 4 мг/кг, от примерно 3,5 мг/кг до примерно 5 мг/кг или от примерно 4 мг/кг до примерно 5 мг/кг.

Однако также предусмотрены дозы ниже или выше доз, указанных в настоящем описании, особенно с учетом факторов, которые необходимо учитывать при дозировке, известных специалисту в этой области техники и/или описанных в настоящем документе. Прогресс у пациента, получающего лечение, можно контролировать путем периодической оценки и при необходимости корректировать дозу.

В данном контексте термин «эффективный ответ» пациента или «ответ» пациента на лечение относится к клинической или терапевтической пользе, которую пациент получает при введении антитела по данному изобретению. Такая польза включает в себя любое одно или большее количество из следующих явлений: повышенную иммунную толерантность трансплантированных органов; стабилизированное аутоиммунное заболевание или нарушение; или ослабление признаков или симптомов аутоиммунного нарушения и т. д.

В настоящем описании термин «значительное высвобождение цитокинов» относится к значительному увеличению измеримого количества цитокинов, которое можно обнаружить способами, известными специалисту в этой области техники. Например, значительное высвобождение цитокинов может быть обнаружено в образцах крови человека путем ELISA, где уровни цитокинов в нестимулированной крови сравнивают с уровнями цитокинов в крови, инкубированной с антителом. В некоторых таких исследованиях, например, может быть обнаружено значительное высвобождение цитокинов, если уровни IFN- γ по меньшей мере в три раза выше в крови, инкубированной с антителом, по сравнению с уровнями в нестимулированной крови.

Потенциальным преимуществом способов, описанных в данном документе, является возможность достижения выраженного и/или длительного облегчения состояния у пациента, страдающего аутоиммунным нарушением, аллергическим заболеванием, астмой или другими воспалительными заболеваниями, с приемлемым профилем безопасности, включающим приемлемую переносимость, уровень токсичности и/или нежелательные явления, так что пациент получает пользу от способа лечения в целом. Эффективность лечения по данному изобретению может быть измерена с помощью различных критериев, которые обычно применяются при оценке лечения различных аутоиммунных нарушений, включая, но не ограничиваясь этим, индекс Американского колледжа ревматологии (ACR) 20, ACR50, ACR70, индекс площади и тяжести псориаза (PASI) 50, PASI75, PASI90, PASI100, индекс активности системной красной волчанки

(SLEDAI). Необязательно могут применяться различные другие подходы к определению эффективности любой конкретной терапии по данному изобретению, включая, например, маркеры активации иммунных клеток, показатели воспаления, визуализацию измерения зависимых от клеточного цикла биомаркеров и/или измерение ответа посредством оценки боли.

Пример: экспрессия и очистка антител

Агонистические антитела к CD200R человека по данному изобретению могут быть экспрессированы и очищены по существу следующим образом. Соответствующую клетку-хозяина, такую как НЕК 293 или CHO, можно временно или стабильно трансфицировать экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимального предварительно определенное отношение векторов HC:LC (например, 1:3 или 1:2) или один вектор системы кодирования как HC, так и LC. Осветленная среда, в которую происходила секреция антитела, может быть очищена с помощью любой из многих обычно применяемых технологий. Например, в случае фрагмента Fab среду удобно наносить на колонку MabSelect® (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов.

Связанное антитело можно элюировать, например, градиентом pH (например, от 20 mM Трис-буфера, pH 7,0, до 10 mM цитратного натриевого буфера, pH 3,0, или от фосфатно-солевого буферного раствора, pH от 7,4, до 100 mM глицинового буфера, pH 3,0). Обнаружение фракций антител можно проводить, например, с помощью SDS-PAGE, а затем проводить их объединение. Дальнейшая очистка является необязательной, в зависимости от предполагаемого использования. Антитело можно концентрировать и/или стерильно фильтровать, используя обычные методики. Растворимые агрегаты и мультимеры можно эффективно удалять обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Чистота антитела после этих стадий хроматографии составляет между от около 95 % до около 99 %.

Примечательно, что С-концевой глицин антитела I-4P или С-концевой лизин антитела I-IgG1 может быть усечен посттрансляционно. Кроме того, N-концевой глутамин антитела I-4P или антитела I-IgG1 может быть превращен в пироглутаминовую кислоту.

Продукт можно хранить в холодильнике, незамедлительно замораживать при -70 °С или можно лиофилизировать. Аминокислотные SEQ ID NO для приведенных в качестве примеров гуманизированных антител по данному изобретению показаны ниже в Таблице 1.

5

Таблица 1. Аминокислотные последовательности приведенных в качестве примеров агонистических антител к CD200R человека.

SEQ ID NO антитела						
Антитело	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Антитело I	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	NO: 1	NO: 2	NO: 3	NO: 4	NO: 5	NO: 6

Антитело	HCVR	LCVR
Антитело I	SEQ ID	SEQ ID
	NO: 7	NO: 8

Антитело	HC	LC
Антитело I-4P	SEQ ID	SEQ ID
	NO: 9	NO: 10

10

Пример: антитело I-4P связывает CD200R человека и яванского макака

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) при 37°C выполняют для определения кинетики связывания и аффинности антитела I-4P к CD200R человека, CD200R яванского макака и CD200RLa яванского макака (в настоящем описании также называется «активирующей формой» яванского макака).

15

Прибор Biacore® T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), реагенты Biacore и программное обеспечение Scrubber2 Biacore® Evaluation (Biologics 2008) используют для SPR-анализа связывания антитела I-4P. Чип CM4 (Biacore P/N BR-1006-68) подготавливают с использованием метода иммобилизации по аминогруппе EDC/NHS в соответствии с изготовителем (Biacore P/N BR-1000-50). Вкратце, поверхности всех 4 проточных ячеек (FC) активируют путем введения смеси EDC/NHS в соотношении 1:1 в течение 7 минут со скоростью 10 мкл/минута. Белок А (Calbiochem P/N 539202) разводят до 100 мкг/мл в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,5, и иммобилизуют для приблизительно 400 RU на всех 4 проточных ячейках путем 7-минутного введения при скорости потока 10

20

мкл/минута. Непрореагировавшие участки блокируют путем 7-минутного введения этаноламина со скоростью 10 мкл/минута. Для удаления любого нековалентно связанного белка используют введение 2 x 10 мкл глицина, pH 1,5. Подвижный буфер представляет собой 1x HBS EP+ (Biacore P/N BR-1006-69).

5 Рецепторы CD200 человека, яванского макака и активирующие рецепторы CD200 яванского макака очищают с использованием ИМАС и эксклюзионной хроматографии. CD200R мыши получают путем расщепления Фактора Ха из слитого белка CD200R Fc мыши собственного получения. Заключительным этапом доочистки рецептора CD200R мыши является эксклюзионная хроматография.

10 Для связывания CD200R человека и яванского макака антитела разводят в рабочем буфере до 2,5 мкг/мл и приблизительно 150 RU антитела I-4P захватывают в проточные ячейки 2–4 (RU-захват). FC1 представляет собой эталонную проточную ячейку; следовательно, в FC1 антитело не захватывают. CD200R человека и яванского макака разводят до 500 нМ в подвижном буфере, а затем подвергают двукратному серийному
15 разведению в подвижном буфере до 3,9 нМ. Осуществляют двойное введение каждой концентрации во все FC со скоростью 50 мкл/минута в течение 250 секунд с последующей фазой диссоциации 1200 секунд. Регенерацию проводят путем введения 15 мкл 10 мМ глицина, pH 1,5, со скоростью 30 мкл/минута дважды во все FC. Данные с вычитанием контрольных значений собирают в виде FC2-FC1, FC3-FC1 и FC4-FC1. Измерения
20 получают при 37°C. Аффинность (K_D) рассчитывают с использованием модели «связывания 1:1 (Ленгмюра)» в BIA Evaluation.

 Для связывания активирующего CD200R яванского макака антитела разводят в рабочем буфере до 2,5 мкг/мл и приблизительно 150 RU антитела I-4P захватывают в проточные ячейки 2–4 (RU-захват). FC1 представляет собой эталонную проточную
25 ячейку. Активирующий CD200R яванского макака разводят до 8.1 мкМ в подвижном буфере, а затем подвергают 2-кратному серийному разведению в подвижном буфере до 63,2 нМ. Осуществляют двойное введение каждой концентрации во все FC со скоростью 50 мкл/минута в течение 250 секунд с последующей фазой диссоциации 1200 секунд. Регенерацию проводят путем введения 15 мкл 10 мМ глицина, pH 1,5, со скоростью 30
30 мкл/мин дважды во все FC. Данные с вычитанием контрольных значений собирают в виде FC2 FC1, FC3 FC1 и FC4-FC1. Измерения получают при 37°C. Аффинность (K_D) рассчитывают с использованием анализа установившегося равновесия с помощью программного обеспечения Scrubber 2 Biacore® Evaluation.

Для связывания CD200R мыши антитела разводят в рабочем буфере до 2,5 мкг/мл и приблизительно 150 RU антитела I-4P захватывают в проточные ячейки 2–4 (RU-захват). FC1 представляет собой эталонную проточную ячейку. CD200R мыши разводят до 10 мкМ в подвижном буфере, а затем подвергают 2-кратному серийному разведению в подвижном буфере до 78 нМ. Осуществляют двойное введение каждой концентрации во все FC со скоростью 50 мкл/минута в течение 250 секунд с последующей фазой диссоциации 1200 секунд. Регенерацию проводят путем введения 15 мкл 10 мМ глицина, рН 1,5, со скоростью 30 мкл/мин дважды во все FC. Данные с вычитанием контрольных значений собирают в виде FC2 FC1, FC3 FC1 и FC4-FC1. Измерения получают при 37°C. Аффинность (K_D) рассчитывают с использованием анализа установившегося равновесия с помощью программного обеспечения Scrubber 2 Biacore® Evaluation.

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные. Как показано в таблице 2, антитело I-4P связывает CD200R человека и CD200R яванского макака с аффинностью в нМ-диапазоне, а антитело I-4P связывает активирующий рецептор CD200RLa с аффинностью в мкМ-диапазоне. Антитело I-4P связывает CD200R мыши с аффинностью > 10 мкМ.

Таблица 2. Аффинность антитела I-4P к рецепторам CD200 человека, яванского макака, активирующим рецепторам CD200 яванского макака и рецепторам CD200 мыши, измеренная с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37°C .

	Рецептор	Средняя K_D	Стд. откл.
Антитело I-4P	Человек	5,6 нМ	1,2
	Яванский макак	2,3 нМ	0,1
	Яванский макак, активирующая форма	2,5 мкМ	0,4
	*CD200R мыши	> 10 мкМ	

n = Анализ проводили три раза; *n = 1 раз проведенный анализ

Эти данные демонстрируют, что антитело I-4P связывает активирующий рецептор CD200RLa и CD200R мыши со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью антитела I-4P к CD200R человека и CD200R яванского макака.

Несмотря на значительное конструирование, направленное на преодоление значительных проблем, связанных с отсутствием перекрестной реактивности между CD200R человека и яванского макака, изомеризацией в стрессовых условиях (в первую очередь за счет остатка аспарагиновой кислоты в LCDR1 (LC D28)) и ненативной дисульфидной связью между HC CDR1 и CDR2, антитело I-4P демонстрировало

благоприятный профиль связывания. Например, методику насыщающего мутагенеза для остатков CDR тяжелой и легкой цепи с использованием экспрессии клеток млекопитающих использовали для определения изменений CDR, которые покрывают аффинный разрыв между CD200R человека и яванского макака. Эту методику также использовали для поиска замены остатка для LC D28 без снижения аффинности. Вторую библиотеку CDR подвергли скринингу с использованием процесса на основе фага, который позволил обнаружить непрогнозируемые и не связанные с зародышевой линией заменяющие остатки для ненативного дисульфида без снижения аффинности связывания антигена.

10

ПРИМЕР: связывание in vitro антитела I-4P с CD200R, экспрессируемым в клетках

CD200R является членом «семейства парных рецепторов», что означает, что существует близкий гомолог с противоположной активирующей активностью. Эта форма не была идентифицирована у людей, но транскрипты мРНК с низким уровнем были описаны в цельной крови и семенниках яванских макаков (в настоящем документе называемые «активирующей формой» яванского макака или «CD200RLa яванского макака»). Следовательно, активирующая форма у яванского макака может вызывать опасение относительно безопасности во время токсикологических исследований у яванских макаков.

15

20

Чтобы определить, связывается ли антитело I-4P с экспрессируемым клетками, мембраносвязанным CD200R яванского макака, человека и активирующей формой CD200RLa яванского макака, используют проточную цитометрию. Клетки CHO трансфицируют CD200R человека (SEQ ID NO: 15), CD200R яванского макака (SEQ ID NO: 16) или активирующей формой яванского макака (SEQ ID NO: 17) и отбирают на основе высокой экспрессии. Клетки (2×10^5) суспендируют в 1×10^6 /50 мкл в PBS для каждой клеточной линии и добавляют краситель FL4 (MultiCyt® Proliferation and Encoder FL4 dye). Краситель FL4 разводят 1:5000 для клеток, экспрессирующих CD200R человека и яванского макака, 1:700 для клеток, экспрессирующих активирующую форму яванского макака, и 1:50 для нетрансфицированных клеток. Краситель смешивают с клетками и смесь инкубируют при 4°C в течение 30 минут в темноте. Клетки дважды промывают 10 мл PBS и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 минут. Затем клетки смешивают в буфере FACS при 8×10^5 клеток/50 мкл/лунка.

25

30

Клетки инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре с титрованием антител в буфере FACS. Клетки один раз промывают буфером FACS и в каждую лунку

добавляют 100 мкл PE-конъюгированного антитела к Fc человека в разведении 1:1000 в течение 15 минут в темноте при 4°C. Клетки три раза промывают, а затем ресуспендируют в 150 мкл буфера FACS. Добавляют Sytox blue (2 мкл/лунка), клетки переносят в планшет FACS и анализируют на приборе для цитометрии Fortessa LSRII (BD Biosciences). Данные анализируют с использованием программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC).

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные. Антитело I-4P связывается с CD200R яванского макака и CD200R человека. Антитело I-4P связывается с активирующей формой яванского макака аналогично связыванию с нетрансфицированными контрольными клетками. Эти данные демонстрируют отсутствие связывания антитела I-4P с активирующей формой яванского макака; таким образом, при токсикологических исследованиях у яванских макаков может быть меньше опасений относительно безопасности.

15 **Пример: антитело I-4P представляет собой агонист CD200R**

Чтобы продемонстрировать агонистическую активность антитела I-4P клеточную линию моноцитов человека U937 (ATCC, CRL1539.2) трансфицируют кДНК для CD200R человека. Выработка цитокинов, включая IL-8, этими клетками может быть индуцирована иммунными комплексами (IC), которые связывают и активируют рецепторы Fcγ. Для стимуляции IC антитело изотипического контроля IgG1 человека наносят на планшет с высокой степенью связывания в течение ночи. На следующий день 4×10^5 CD200R-экспрессирующих клеток U937/лунка инкубируют с различными концентрациями антитела I-4P в течение 1 часа на льду перед добавлением в предварительно покрытый планшет для стимуляции IC и инкубируют при 37°C в течение 24 часов. Через 24 часа клетки центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость и концентрацию IL-8 измеряют с помощью набора MSD kit (MesoScale Diagnostics).

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные. Как показано в таблице 3, снижение уровня IC-индуцированного IL-8 с помощью антитела I-4P в виде процента ингибирования сравнивали с изотипическим контролем в соответствующей концентрации. Относительная IC₅₀ основана на четырёхпараметрической логистической модели подгонки наклона процента ингибирования в зависимости от концентрации. Определяли, что средняя IC₅₀ из 3 независимых экспериментов составляла 0,2 мкг/мл ± 0,02 мкг/мл.

Таблица 3. Зависимое от концентрации ингибирование индуцированной иммунным комплексом секреции IL-8 в клетках, экспрессирующих CD200R человека.

Антитело I-4P (мкг/мл)	средний % ингибирования IL-8	SEM (стандартная ошибка среднего)
0,01	-2,0	3,1
0,03	2,3	2,9
0,1	14,0	6,0
0,3	24,0	4,2
1	47,1	2,8
3	55,7	2,9
10	67,8	3,3
30	76,2	4,0

Эти данные демонстрируют, что антитело I-4P способно ингибировать IC-индуцируемую выработку IL-8 в зависимости от концентрации.

Также исследуют способность агонистических антител к CD200R с остовами различных изотипов агонизировать CD200R и ингибировать стимулированное иммунным комплексом высвобождение IL-8 из клеток U937, экспрессирующих CD200R человека.

Для стимуляции, антитело изотипического контроля IgG1 наносят в концентрации 10 мкг/мл на планшет с высокой степенью связывания в течение ночи. На следующий день 4×10^5 CD200R-экспрессирующих клеток U937/лунка инкубируют с различными концентрациями антитела IgG4PAA (известно, что две замены лейцина на аланин (SLL228PAA) нарушают гидрофобные взаимодействия с FcγRs с устранением остаточной эффекторной функции) или антитела I-4P в течение 1 часа на льду перед добавлением в предварительно покрытый планшет для IC-стимуляции с последующей инкубацией при 37°C в течение 24 часов. Клетки центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость и концентрацию IL-8 измеряют с использованием набора MSD kit (Mesoscale Diagnostics) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации IL-8 переводят в процент ингибирования относительно изотипического контроля. Строят график зависимости концентрации IL-8 от концентрации антитела и используют 4-параметрическую логистическую модель для сопоставления процента ингибирования с логарифмом концентрации с использованием статистического программного обеспечения R. Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные (приведены в таблице 4).

Таблица 4. Снижение выработки IL-8 в зависимости от концентрации

Антитело, мкг/мл	IgG4PAA		IgG4SP	
	сред.% ингибирования IL-8	SEM*	сред.% ингибирования IL-8	SEM*
0,01	-3,2	6,0	15,4	3,7
0,03	-5,0	5,6	35,8	3,6
0,1	-10,4	10,1	44,0	3,0
0,3	15,0	5,3	80,0	2,8
1	16,9	3,9	73,8	1,8
3	35,5	4,1	82,0	2,6
10	45,4	1,7	87,1	1,4
30	53,5	3,2	86,4	1,5

*Стандартная ошибка среднего

Эти данные демонстрируют, что IgG4PAA обладает более слабой ингибирующей активностью ($IC_{50} = 1,45$ мкг/мл) по сравнению с антителом I-4P ($IC_{50} = 0,07$ мкг/мл).

5

ПРИМЕР: связывание рецептора Fcγ необходимо для агонизма *in vivo*

Кластеризация через рецептор Fcγ в липидном рафте может повышать ингибирующую активность в отношении воспалительных клеток. Чтобы определить, является ли взаимодействие рецептора Fcγ полезным для агонизма через CD200R, конструируют два антитела к CD200R мыши; один для устранения любого связывания рецептора Fcγ (mIgG2aAA) и один для обеспечения функционального связывания рецептора Fcγ (mIgG2a). Обе молекулы тестируют в двух независимых моделях индуцированного воспалительного заболевания у мышей; модели контактного дерматита и модели CD40-индуцированного воспаления толстой кишки.

15 Модель контактного дерматита: способность агонистических антител к CD200R человека лечить контактный дерматит может быть определена с помощью модели у мышей *in vivo* по существу так, как описано ниже (см., например, Tolstrup et al., Anti-inflammatory effect of a retrovirus-derived immunosuppressive peptide in mouse models, BMC Immunology 2013, 14:51). Самцов мышей C57Bl/6J в возрасте 12 недель анестезируют, бреют брюшко и на выбритую область наносят 100 мкл 3% оксазалона в этаноле. Через 20 семь дней после сенсibilизации агонистическое антитело к CD200R, IgG2a или IgG2aAA, вводят подкожно (п/к) в количестве 0,1, 1 или 10 мг/кг, или вводят подкожно изотипический контроль mIgG2a в количестве 10 мг/кг для сравнения. Через четыре часа после введения антитела мышью анестезируют, измеряют исходную толщину уха 25 штангенциркулем и осуществляют стимуляцию на ушах 10 мкл 2% оксазалона в этаноле с каждой стороны обеих ушей. Через двадцать четыре часа после стимуляции снова

измеряют толщину уха. Реакцию гиперчувствительности оценивают путем измерения разницы между толщиной уха до и через 24 часа после стимуляции. Статистические различия относительно изотипического контроля определяют с использованием 1-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета (GraphPad Prism).

5 Модель CD40-индуцированного воспаления толстой кишки: способность агонистических антител к CD200R человека лечить модель CD40-индуцированного воспаления толстой кишки может быть определена с помощью модели у мышей *in vivo* по существу так, как описано ниже. Самкам мышей RAG2N12 (B6.129S6-Rag2tm1Fwa N12; Taconic) в возрасте 14 недель вводят 100 мкг/мышь антитела анти-CD40 (клон BioXcel FGK4.5) путем инъекции для индукции воспаления толстой кишки. Через час после индукции заболевания подкожно вводят агонистическое антитело к CD200R IgG2a, IgG2aAA или антитело изотипического контроля в количестве 0,1, 1 или 10 мг/кг. Через 15 шесть дней животных умерщвляют и определяют воспаление толстой кишки путем измерения длины и массы толстой кишки. Соотношение длины и массы толстой кишки используют для определения воспаления толстой кишки. Статистические различия относительно изотипического контроля определяют с использованием 1-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета (GraphPad Prism).

20 Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные.

Таблица 5. Воспаление уха, измеренное в модели контактного дерматита по изменению толщины уха (мм)

Толщина уха (мм)		
	mIgG2a	mIgG2aAA
Изотипический контроль	0,200 ± 0,05	0,200 ± 0,05
10 мг/кг	0,118±0,03**	0,160±0,03*
1,0 мг/кг	0,113±0,06**	0,170±0,04
0,1 мг/кг	0,176±0,05	0,178±0,03

*p<0,05; ** p<0,001. n=5/группа

Таблица 6. Воспаление толстой кишки, измеренное в модели CD40-индуцированного воспаления толстой кишки по соотношению массы и длины (мг/см)

Соотношение длины и массе толстой кишки (мг/см)		
	mIgG2a	mIgG2aAA
Изотипический контроль	37±1,1	37±1,1
10 мг/кг	26±0,8**	33±0,7
1,0 мг/кг	29±1,6*	36±1,9
0,1 мг/кг	32±2,6	36 (n=1)

n=5/группа, *p<0,05; ** p <0,001.

Эти данные демонстрируют, что по сравнению с изотипическими контролями антитело с полной эффекторной функцией (mIgG2a) проявляло иммуносупрессивную функцию в обеих моделях. Однако нулевой вариант рецептора Fcγ (mIgG2aAA) был гораздо менее эффективен в модели контактного дерматита и практически не демонстрировал эффекта в модели воспаления толстой кишки. Различие в активности не было обусловлено истощением клеток, экспрессирующих CD200R, поскольку в независимом эксперименте было продемонстрировано, что Fcγ-рецептор-компетентное антитело IgG2a не истощает клетки, экспрессирующие CD200R, у мышей (данные не представлены).

Эти данные демонстрируют, что связывание рецептора Fcγ необходимо для обеспечения оптимального агонизма в отношении CD200R для опосредования противовоспалительного сигнала.

Пример: связывание антитела I с рецепторами Fcγ

Чтобы определить, влияет ли Fc антитела на характеристики связывания антитела I-4P с рецепторами Fcγ, связывание антитела I-4P, антитела I-IgG1 и антитела I-4PAA с внеклеточными доменами (ECD) рецептора FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa человека измеряют посредством SPR при 25°C. Антитело I-IgG1 и антитело I-4PAA содержат такие же CDR, что и антитело I-4P. Антитело I-IgG1 содержит такие же HCVR, LCVR и LC, что и антитело I-4P, но антитело I-IgG1 содержит HC, аминокислотная последовательность которой представлена SEQ ID NO: 11. Антитело I-4PAA отличается от антитела I-4P наличием мутации SLL228PAA в HC.

Прибор Biacore® T100 и Biacore® 3000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), реагенты Biacore® и программное обеспечение Scrubber2 Biacore® Evaluation (Biologics 2008) используют для SPR-анализа связывания антитела. Чип CM5 (Biacore® P/N BR-1006-68)

подготавливают с использованием метода иммобилизации по аминогруппе EDC/NHS в соответствии с изготовителем (Biacore® P/N BR-1000-50). Вкратце, поверхности всех 4 FC активируют путем введения смеси EDC/NHS в соотношении 1:1 в течение 7 минут со скоростью 10 мкл/минута. Белок А (Calbiochem P/N 539202) разводят до 100 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,5, и иммобилизуют для приблизительно 400 RU на всех 4 проточных ячейках путем 7-минутного введения при скорости потока 10 мкл/минута. Непрореагировавшие участки блокируют путем 7-минутного введения этаноламина со скоростью 10 мкл/минута. Для удаления любого нековалентно связанного белка используют введение 2 x 10 мкл глицина, pH 1,5.

10 FcγR ECD -FcγRI (CD64), FcγRIIA_131R и FcγRIIA_131H (CD32a), FcγRIIA_158V, FcγRIIA_158F (CD16a) и FcγRIIb (CD32b; ингибирующий рецептор) (см., например, Bruhns *et al.*, Blood. 2009 Apr 16;113(16):3716-25) получают в результате стабильной экспрессии клеток CHO в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники, и очищают с использованием IgG Сефарозы и эксклюзионной хроматографии.

15 Для связывания FcγRI антитела разводят в подвижном буфере до 2,5 мкг/мл (1x HBS-EP+ (Biacore® P/N BR-1006-69) и приблизительно 150 RU каждого антитела захватывают в проточные ячейки 2–4 (RU-захват). FC1 представляет собой эталонную проточную ячейку, следовательно, в FC1 антитело не захватывают. ECD FcγRI разводят до 200 нМ в подвижном буфере, а затем подвергают двукратному серийному разведению в подвижном буфере до 0,78 нМ. Осуществляют двойное введение каждой концентрации во все FC со скоростью 40 мкл/минута в течение 120 секунд с последующей фазой диссоциации 1200 секунд. Регенерацию проводят путем введения 15 мкл 10 мМ глицина, pH 1,5, со скоростью 30 мкл/минута во все FC. Данные с вычитанием контрольных значений собирают в виде FC2-FC1, FC3-FC1 и FC4-FC1. Измерения получают при 25°C. Аффинность (K_D) рассчитывают с использованием либо анализа установившегося равновесия с помощью программного обеспечения Scrubber 2 Biacore® Evaluation, либо модели «связывания 1:1 (Ленгмюра)» в BIA Evaluation.

20 Для связывания FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa антитела разводят до 5 мкг/мл в подвижном буфере и приблизительно 500 RU каждого варианта захватывают в проточные ячейки 2–4 (RU-захват). FC1 представляет собой эталонную проточную ячейку. ECD рецептора Fcγ разводят до 10 мкМ в подвижном буфере, а затем подвергают 2-кратному серийному разведению в подвижном буфере до 39 нМ. Осуществляют двойное введение каждой концентрации во все FC со скоростью 40 мкл/минута в течение 60 секунд с

последующей фазой диссоциации 120 секунд. Регенерацию проводят путем введения 15 мкл 10 мМ глицина, рН 1,5, со скоростью 30 мкл/мин во все FC. Данные с вычитанием контрольных значений собирают в виде FC2-FC1, FC3-FC1 и FC4-FC1. Измерения получают при 25°C. Аффинность (K_D) рассчитывают с использованием анализа установившегося равновесия с помощью программного обеспечения Scrubber 2 Biacore® Evaluation.

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные, приведенные в таблице 7.

10

15

20

25

30

35

40

Таблица 7: параметры связывания *in vitro* для антитела I-4P, антитела I-IgG1 и антитела I-4PAA в отношении ECD рецептора Fc γ человека рецептора, измеренные с использованием SPR при 25°C

Образец	Лиганд человека	Средняя KD	Стд.откл.*
Контрольное антитело IgG1	Fc γ RI	56,1 пМ	2,2
Контрольное антитело IgG4 PAA	Fc γ RI	229,0 нМ	11,5
Антитело I-IgG1	Fc γ RI	48,9 пМ	2,2
Антитело I-4PAA	Fc γ RI	273,3 нМ	12,6
Антитело I-4P	Fc γ RI	369,3 пМ	9,2
Контрольное антитело IgG1	Fc γ RIIA_131H	0,5 мкМ	0,0
Контрольное антитело IgG4 PAA	Fc γ RIIA_131H	>10 мкМ	
Антитело I-IgG1	Fc γ RIIA_131H	0,5 мкМ	0,0
Антитело I-4PAA	Fc γ RIIA_131H	>10 мкМ	
Антитело I-4P	Fc γ RIIA_131H	3,9 мкМ	0,3
Контрольное антитело IgG1	Fc γ RIIA_131R	0,6 мкМ	0,0
Контрольное антитело IgG4 PAA	Fc γ RIIA_131R	>10 мкМ	
Антитело I-IgG1	Fc γ RIIA_131R	0,6 мкМ	0,0
Антитело I-4PAA	Fc γ RIIA_131R	>10 мкМ	
Антитело I-4P	Fc γ RIIA_131R	1,7 мкМ	0,1
Контрольное антитело IgG1	Fc γ RIIb	2,8 мкМ	0,1
Контрольное антитело IgG4 PAA	Fc γ RIIb	>10 мкМ	
Антитело I-IgG1	Fc γ RIIb	2,8 мкМ	0,1
Антитело I-4PAA	Fc γ RIIb	>10 мкМ	
Антитело I-4P	Fc γ RIIb	2,2 мкМ	0,1
Контрольное антитело IgG1	Fc γ RIIIA_158V	0,2 мкМ	0,0
Контрольное антитело IgG4 PAA	Fc γ RIIIA_158V	8,9 мкМ	1,1
Антитело I-IgG1	Fc γ RIIIA_158V	0,2 мкМ	0,0
Антитело I-4PAA	Fc γ RIIIA_158V	>10 мкМ	
Антитело I-4P	Fc γ RIIIA_158V	4,3 мкМ	0,4
Контрольное антитело IgG1	Fc γ RIIIA_158F	1,0 мкМ	0,1
Контрольное антитело IgG4 PAA	Fc γ RIIIA_158F	>10 мкМ	
Антитело I-IgG1	Fc γ RIIIA_158F	0,9 мкМ	0,1
Антитело I-4PAA	Fc γ RIIIA_158F	>10 мкМ	
Антитело I-4P	Fc γ RIIIA_158F	>10 мкМ	

Анализ проводили три независимых раза.

5 *Стандартное отклонение не определяли для измерений > 10 мкМ.

В таблице 7 суммирована аффинность (K_D) антитела I-IgG1, антитела I-4PAA и антитела I-4P к ECD рецептора Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa, измеренная посредством SPR. Характеристики связывания антитела I-4P демонстрируют связывание с рецепторами Fc γ со значениями аффинности, которые по существу находятся в

10

промежутке между значениями аффинности связывания контроля IgG1/антитела I-IgG1 и контроля IgG4 PAA/антитела I-4PAA. Например, данные показывают, что антитело I-4P демонстрирует уменьшение связывания с ECD рецептора FcγRIIIa по сравнению с антителом I-IgG1 (что может быть связано с высвобождением цитокинов в анализе 5 цельной крови), но по-прежнему обладает более высокой аффинностью связывания с ECD рецептора FcγRI и FcγRIIb по сравнению с антителом I-4PAA.

Полагают, что характеристики связывания, демонстрируемые антителом I-4P в отношении FcγR, вносят вклад в повышение эффективности *in vivo*, не вызывая при этом 10 значительного высвобождения цитокинов.

Пример: связывание мутантов Fc IgG1 с рецепторами Fcγ

Известно, что антитела IgG1 индуцируют высвобождение цитокинов. Для определения механизма высвобождения цитокинов, индуцируемого IgG1, осуществляют мутации IgG1-Fc. Эти антитела к CD200R содержат CDR, отличные от антитела I.

15 Антитела в таблице 8 (IgG1, отсутствие мутаций, P331S, P331S + S267G, A330S + P331S + S267G, A330S + S267G, K322A, K322A + S267G, and N325S + L328F + S267G) содержат идентичные CDR. Антитело S267G содержит CDR, отличные от CDR других мутантов антитела и антитела I-4P.

Мутацию S267G осуществляют для уменьшения связывания FcγRIII (нумерация 20 EU: см., например, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); и Shields RL et al., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to Fc gamma R. 2001 J. Biol. Chem. 276, 6591-6604).

25 Мутацию S267G также комбинируют с мутациями, которые уменьшают связывание C1q без значительного влияния на FcγR-связывание (K322A, A330S и P331S; см., например, Oganesyanyan V et al., 2008 Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 64, 700-704; Idusogie, E et al., 2000 Mapping of the C1q Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with 30 a Human IgG1 Fc. J. of Immunology, 164(8) 4178-4184; и Tao M.H. and Morrison M.L. 1993 Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. J. of Exp. Med., 178(2), 661-667). Также осуществляют дополнительные мутации, уменьшающие связывание FcγRIII и C1q при модулировании связывания с FcγRIIIA and FcγRIIB (N325S+L328F; см., например, Shang L et al., 2014

Selective antibody intervention of Toll-like receptor 4 activation through FcγR tethering. *J. Biol. Chem.* 289, 15309-18; Monnet E *et al.*, 2017 Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 101, 200-208).

- 5 Связывание рецептора Fcγ определяют с помощью Biacore®, и IFNγ определяют путем мультиплексного анализа на основе платформы Mesoscale, как описано в настоящем документе. Связывание C1q определяют путем ELISA. Для ELISA на 96-луночный микропланшет наносят 100 мкл/лунка каждого антитела, разведенного в DPBS (HyClone Дульбекко) в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 0,19 мкг/мл.
- 10 Тестирование проводят в дублирующих лунках. Планшет герметично закрывают и инкубируют в течение ночи при 4°C. Из каждой лунки удаляют реагент для покрытия и добавляют 200 мкл/лунка блокирующего реагента казеина (Thermo). Планшет герметично закрывают и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре (RT). Каждую лунку 3 раза промывают промывочным буфером (1 x TBE с 0,05% Твин 20). Добавляют
- 15 100 мкл/лунка C1q человека (MS Biomedical) в концентрации 10 мкг/мл, разведенного блокирующим реагентом казеином, и инкубируют в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем планшет трижды промывают промывочным буфером перед добавлением 100 мкл/лунка 1:800 разведения антитела овцы к C1q-HRP человека (Abcam # ab46191) в блокирующем реагенте казеине и инкубацией в течение 1 часа при комнатной
- 20 температуре. Планшет 6 раз промывают промывочным буфером и в каждую лунку добавляют 100 мкл/лунка субстрата ТМВ (Pierce) и инкубируют в течение 7 минут. В каждую лунку добавляют 100 мкл 1 N HCl для остановки реакции. Сразу же измеряют оптическую плотность с использованием колориметрического микропланшет-ридера, установленного на 450 нм.
- 25 Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные (N=1; таблица 8).

Таблица 8. Измерения связывания FcγR и C1q, и высвобождения цитокинов в цельной крови в случае мутантов IgG1.

Мутация	FcγRI, пМ	FcγRIIA_ 131H, мкМ	FcγRIIA_ 131R, мкМ	FcγRIIb, мкМ	FcγRIIA_ 158V, мкМ	FcγRIIA_ 158F, мкМ	C1q, Elisa	Высвобождение IFNγ в цельной крови ^a
IgG1 человека	55,2	0,71	1,03	4,2	0,28	2,59	++	Н/О
IgG1, отсутствие мутаций	46,4	0,69	1,04	4,23	0,27	2,12	+++	Да
P331S	54,3	1,15	1,14	4,64	0,45	3,11	+	Да
P331S + S267G	142,4	5,2	0,77	4,38	2,08	>10	-	Нет
A330S + P331S + S267G	511,4	5,1	0,78	4,3	2,48	9,8	-	Нет
A330S + S267G	167,7	3,31	0,82	4,99	1,66	10,83	-	Нет
K322A	30,5	0,98	0,82	3,41	0,28	2,58	-	Да
K322A + S267G	70,5	5,02	0,66	4,43	1,65	9,99	-	Нет
N325S + L328F	68,7	2,64	0,06	0,275	7,35	>10	-	Нет
S267G	130,7	3,13	0,53	3,41	0,73	4,5		Да
Контрольное антитело IgG4P человека	384,7	5,12	2,89	3,31	5,47	>10	-	Нет

^a Любое высвобождение цитокинов, значительно превышающее исходные уровни в цельной крови,

5 фиксировали как «Да», однако точные уровни по сравнению с исходными уровнями могут варьироваться.

10 Эти данные демонстрируют, что комбинирование мутаций, уменьшающих связывание C1q и изменяющих связывание FcγR, приводит к отсутствию высвобождения IFNγ по сравнению с исходным уровнем, что предполагает более желаемый профиль безопасности при введении пациентам. Например, уменьшение связывания C1q и уменьшение связывания с FcγRIII (или FcγRI) приводит к отсутствию высвобождения IFNγ по сравнению с исходным уровнем.

ПРИМЕР: высвобождение цитокинов *in vitro*

Клиническую токсичность, включая синдром высвобождения цитокинов (CRS), связывали с введением антител. CRS, одно из самых серьезных нежелательных явлений, связанных с моноклональными антителами, характеризуется высокими уровнями активации иммунных клеток и быстрым системным высвобождением провоспалительных цитокинов и потенциально может быть летальным. Важно отметить, что доклинические модели не позволяют в достаточной степени прогнозировать потенциальный риск CRS. Следовательно, для снижения потенциальных рисков CRS после введения антител разработан анализ высвобождения цитокинов *in vitro* с использованием клеток крови человека. Связывание антитела, в частности антитела IgG1, с рецепторами Fc γ может вызывать нежелательное высвобождение цитокинов.

Чтобы определить, индуцирует ли антитело I-4P или антитело I-IgG1 высвобождение цитокинов из нестимулированной цельной крови человека, проводят исследование высвобождения цитокинов *in vitro*. Свежесобранную цельную кровь от шести здоровых людей инкубируют с 100 мкг/мл антитела I-4P, антитела I-IgG1 или контрольного антитела IgG1 в течение 24 часов. Положительный контроль представляет собой гомолог IgG1-антитела Campath-1H (анти-CD52), которое, как известно, вызывает синдром высвобождения цитокинов в клинике. Отрицательный контроль представляет собой антитело hIgG1, которое не вызывает высвобождения цитокинов. С использованием коммерчески доступного мультиплексного анализа на основе платформы Mesoscale измеряют десять цитокинов, включая IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-13, IL-8, IL-12p70, IL-10 и TNF- α , в надосадочных жидкостях клеточных культур.

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные. Как показано в Таблице 9, инкубация цельной крови с 10 мкг/мл антитела положительного контроля приводила к устойчивой выработке цитокинов для 9 из 10 анализируемых цитокинов у большинства доноров. Инкубация цельной крови с антителом I-IgG1 индуцировала значительное высвобождение IFN- γ . Инкубация цельной крови со 100 мкг/мл антитела I-4P или 100 мкг/мл IgG1 отрицательного контроля не приводила к значительным уровням никакого из оцениваемых цитокинов.

Таблица 9. Кратность изменения относительно исходного уровня (контрольный образец PBS); срединное значение \pm SEM

Цитокин	Антитело I-IgG1	Антитело I-4P	Отрицательный контроль	Положительный контроль
IFN- γ	10 \pm 19	0,9 \pm 0,08	0,8 \pm 0,06	612 \pm 431
IL-1 β	1,8 \pm 3	1,19 \pm 2	1,04 \pm 1,4	3 \pm 5
IL-2	0,36 \pm 0,14	1,7 \pm 0,133	1,9 \pm 0,86	1,33 \pm 1,3
IL-4	0,96 \pm 1,4	1,08 \pm 0,42	0,83 \pm 0,73	10 \pm 24
IL-6	1,25 \pm 1,8	1,17 \pm 0,17	1,03 \pm 0,13	15 \pm 18
IL-8	1,1 \pm 0,58	1,2 \pm 0,08	1,25 \pm 0,24	8,8 \pm 5
IL-10	0,88 \pm 0,11	1,25 \pm 0,15	1,26 \pm 0,3	3,9 \pm 2,6
IL-12p70	0,97 \pm 0,37	0,63 \pm 0,19	0,49 \pm 0,5	7 \pm 11
IL-13	1,18 \pm 0,27	1,18 \pm 0,12	1,1 \pm 0,24	5,5 \pm 1,89
TNF- α	1,37 \pm 0,4	1,1 \pm 0,05	0,96 \pm 0,07	20 \pm 17

Эти данные демонстрируют, что антитело I-4P не вызывает значительного высвобождения цитокинов и позволяют предположить низкий риск высвобождения цитокинов в клинике после введения антитела I-4P.

ПРИМЕР: антитело I не блокирует связывание CD200 с CD200R

Как CD200, так и CD200R представляют собой молекулы, экспрессируемые клетками, и содержат два Ig-подобных домена. Они взаимодействуют через NH2-концевые домены, совместимые с иммунологическими синапс-подобными взаимодействиями, происходящими между миелоидными клетками и другими клетками, экспрессирующими CD200. Чтобы определить, связывает ли антитело I-4P CD200R в присутствии лиганда, проводят эксперименты по совместному связыванию на клетках HEL92.7.1, линии клеток эритробластомы человека, экспрессирующей CD200R, путем проточной цитометрии. Для исследования 2×10^5 клетки инкубируют (предварительно обрабатывают) с 300 нМ CD200Fc (RD Systems; слитый белок Fc-области иммуноглобулина 1 с CD200), антителом I-4P, антителом изотипического контроля или PBS в течение одного часа при комнатной температуре. Клетки 3 раза промывают и инкубируют с Fc блокирующим агентом (Miltenyi Biotec) в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки окрашивают различными концентрациями антитела I-4P, меченого AF647, в течение одного часа при комнатной температуре, а затем клетки промывают и суспендируют в буфере FACS для анализа путем проточной цитометрии.

Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) определяют для каждой концентрации антитела I-4P, меченого AF647, и MFI показывает величину связывания в

присутствии лиганда. Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали данные, приведенные в Таблице 10.

Таблица 10. Связывание антитела в присутствии CD200.

Краситель	Без предварительной обработки	Предварительная обработка		
		Изотипический контроль (MFI)	Антитело I-4P (MFI)	CD200-Fc (MFI)
Антитело I-4P-AF647 (мкг/мл)	Без предварительной обработки (MFI)			
0	49,1	49,1	49,1	49,1
0,4	416	399	70,4	230
0,8	694	664	76,3	370
1,6	1184	1154	96,9	630
3,125	1979	1914	133	1068
6,25	3097	2987	200	1728
12,5	4216	4105	319	2641
25	5137	4916	496	3421
50	5651	5515	745	3957

5

Эти данные демонстрируют, что антитело I-4P не блокирует связывание лиганда CD200 с CD200R человека (данные CD200-Fc человека по сравнению с изотипическим контролем и данные при отсутствии предварительной обработки). Данные предварительной обработки антитела I-4P служат в качестве контроля и демонстрируют уменьшение связывания меченого антитела I-4P после предварительной обработки антителом I-4P.

10

Было определено, что эпитоп для антитела I-4P находится близко к клеточной мембране на домене 2 CD200R (данные не представлены).

15

ПРИМЕР: антитело I-4P ингибирует контактную гиперчувствительность у гуманизированных мышей

Чтобы продемонстрировать противовоспалительные эффекты антитела I-4P, самок мышей huNOG-EXL (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(SV40/HTLV-IL3,CSF2)10-7Jic/JicTac) приобретают у Taconic Biosciences в возрасте 20 недель и дают им возможность акклиматизироваться в течение более, чем 1 недели. Мышей содержат по четыре мыши в клетке при температуре 22°C и 12-часовом цикле свет:темнота, и обеспечивают кормом и водой без ограничения. В 0 день мышей анестезируют 5% изофлураном, бреют брюшко и на выбритую область наносят 100 мкл 3% оксазалона в этаноле. Через пять дней после сенсibilизации антитело I-4P вводят подкожно (п/к) в

20

количестве 1 или 10 мг/кг подкожно (п/к); для сравнения вводят подкожно изотипический контроль IgG4P в количестве 10 мг/кг. Через четыре часа после введения антитела мышью анестезируют 5% изофлураном, измеряют толщину уха штангенциркулем и осуществляют стимуляцию на ушах 10 мкл 2% оксазалона в этаноле с каждой стороны обеих ушей.

- 5 Процедуру стимуляции повторяют в 10 и 14 дни. Реакцию гиперчувствительности оценивают путем измерения разницы между толщиной уха до и через 24 часа после стимуляции.

Статистика: воспаление определяют путем измерения различий в толщине уха до и через 24 часа после стимуляции для каждой стимуляции. Процент ингибирования рассчитывают исходя из средней толщины уха для изотипических контролей, для которых ингибирование установлено на уровне 0%. Статистические различия относительно изотипического контроля определяют с использованием 1-факторного или 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета при необходимости (GraphPad Prism).

- 15 Следуя методикам по существу так, как описано выше, получали следующие данные. Как показано в таблице ниже, однократное лечение антителом I-4P в количестве 1 или 10 мг/кг подкожно за 4 часа до первой стимуляции значительно уменьшало воспалительный ответ после третьей стимуляции по сравнению с мышами, получавшими лечение изотипом.

20

Таблица 11.

Лечение	Дельта толщины уха (мм) ± SEM	% ингибирования изотипа	p-значение
Изотипический контроль	0,108 ± 0,005	N/A	
Антитело I-4P 10 мг/кг	0,056 ± 0,008	47,9 ± 7,8	0,0001
Антитело I-4P 1 мг/кг	0,064 ± 0,007	41,4 ± 6,4	0,0001

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

HCDR1 антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 1)

KASGFSFSSGYUMA

5

HCDR2 антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 2)

LIGVGSGLWYAQKFQG

HCDR3 антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 3)

10 ARHFALSDPFNL

LCDR1 антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 4)

QASESIDSYLL

15 **LCDR2 антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 5)**

KQASTLAS

LCDR3 антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 6)

QNYDISND

20

Антитело HCVR антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 7)

XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSFSSGYMAWVRQAPGQGLEWMGLIGVGSGLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDPFNLWGQGLVTVSS

25 где Хаа в положении 1 представляет собой глутамин или пироглутаминовую кислоту

Антитело LCVR антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 8)

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCQASESIDSYLLWYQKPDQSPKLLIKQASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNYDISNDFGGGTKVEIK

30

Тяжелая цепь Антитела I-4P (SEQ ID NO: 9)

XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYMAWVRQAPGQGLEWMGLIGVGS
SLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDPFNLWGQGT
L
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
5 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
DKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX

10 где Хаа в положении 1 представляет собой либо глутамин, либо пироглутаминовую кислоту; и Хаа в положении 446 либо представляет собой глицин, либо отсутствует.

Легкая цепь антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 10)

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCQASESIDSYLLWYQQKPDQSPKLLIKQASTLASGVPSR
15 FSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNYIDISSNDFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 11)

20 XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYMAWVRQAPGQGLEWMGLIGVGS
SLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDPFNLWGQGT
L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
25 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX

где Хаа в положении 1 представляет собой либо глутамин, либо пироглутаминовую кислоту; и Хаа в положении 450 либо представляет собой лизин, либо отсутствует.

30

ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела I-4P (SEQ ID NO: 12)

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgagggttctcgaaggcatctggattctcctcagta
gcggtactacatggcatgggtgcggcaggccctggacaagggttgagtgatgggactgattggtgttgtagtgtagcctatggta
cgcgcagaagttccaaggccgggtcaccatgaccaggacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgag

gacacggccgtgtattactgtgcgagacattttgctctgtctgatcccttaacttggggccagggcacactcgtcaccgtctcctcagcta
gcaccaagggcccatcggctctccccctggcaccctgctccaaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtaaggac
tactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtctcaggac
tctactccctcagcagcgtggtagcctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaca
5 ccaaggtggacaagagagttgagccaatatggccccatgccaccctgccagcacctgagttcctggggggaccatcagttctct
gttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgctgggtggacgtgagccaggaagaccccg
aggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgt
gtggtcagcgtcctcacctctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaaggcctcccgtcctcc
atcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaaga
10 accaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaaca
ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcagggagg
gaaatgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctctgggt

ДНК, кодирующая легкую цепь антитела I-4P и антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 13)

15 gaaattgtgtgactcagctccagactttcagctgtgactccaaggagaaagtcaccatcacctgccaggccagtgagtcgattgatagc
tattfactgtggtaccagcagaaccagatcagctctccaagctcctcatcaagcaggcatccactctggcatctgggtccccctcagaggtc
agtggcagtggtatctgggacagattcacctcaccatcaatagcctggaagctgaagatgctgcaacgtattactgtcaaaactattatgata
ftagtagtaatgatttcggcggaggaccaaaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc
agttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctcc
20 aatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagc
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt
gc

ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела I-IgG1 (SEQ ID NO: 14)

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagtttctgcaaggcatctggatttccttcagta
gcggtactacatggcatgggtgctggcaggccctggacaagggttgagtgatgggactgattggtggtgtagtggtagcctatggta
cgcgcaagaagttccaaggccgggtcaccatgaccaggacacgtccacgagcacagctctacatggagctgagcagcctgagatctgag
5 gacacggcctgtattactgtgcgagacatttgctctgtctgatcccttaactgtggggccagggcacactcgtcaccgtctcctcagcta
gcaccaagggccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctggggcacagcgccctgggctgctgtgtaaggac
tactccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggtgacacacttcccggctgtcctacagtctcaggac
tctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagactacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaac
caaggtggacaagaaagttgagcccaatcttgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtc
10 agtcttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa
gacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagca
cgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcc
cagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagct
gaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
15 agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggc
agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggtaag

CD200R человека (SEQ ID NO: 15)

MLCPWRTANLGLLLILTIFLVAEAEGAAQPNNLMLQTSKENHALASSSLCMDEKQITQ
20 NYSKVLAEVNTSWPVKMATNAVLCPPIALRNLIITWEILRGQPSTKAYRKETNETK
ETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRPVAITHDGYRRCIMVTPDGNFHRGYHLQVLVTPEL
TLFQNRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPEGDCATKQEYWSNGT VTVKSTCHWEVHNVS
TVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKLYIPYIILTIILTIVGFIWLLKVNGCRKYKL
NKTESTPVVEEDEMOPYASYTEKNNPLYDTTNKVKASQALQSEVDTDLHTL

25

CD200R яванского макака (SEQ ID NO: 16)

MLCPWRTANLGLLLILAVFLVAEAEGAAQSNNSLMLQTSKENHTLASNSLCMDEKQIT
QNHSKVLAEVNISWPVQMARNAVLCPPIEFRNLIVITWEILRGQPSTKTYRKDTNET
KETNCTDERITWVSTPDQNSDLQIHPVAITHDGYRRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVTP
30 VTLFESRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPAGDCAPTEQEYWGNGT VTVKSTCHWEGHN
VSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKLYMPYVILTIILTIVGFIWLLKISGCRKY
NLNKTESTSVVEEDEMOPYASYTEKNNPLYDTTNKVKASQALQSEVGTDLHTL

CD200RLa яванского макака (SEQ ID NO: 17)

MHTLGKMSASRLLISIIIMVSASSSSCMDGKQMTQNYSKMSAEGNISQPVLMDTNAMLC
CPPIEFRNLIVIVWEIIIIRGQPSCTKAYRKETNETKETNCTDERITWVSTPDQNSDLQIHPV
AITHDGYRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTLFQSRNRTAVCKAVAGKPAAQISWI
PAGDCAPTEHEYWGNGT VTVESMCHWGDHNA STM TCHVSHLTGNKSLYIKLNSGLRT
5 SGSPALDLLIILYVKLSLFFVILVTTGFVFFQRINYVRKSL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает CD200R человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), причем указанная HCVR содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где аминокислотная последовательность HCDR1 представлена SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 представлена SEQ ID NO: 2 и аминокислотная последовательность HCDR3 представлена SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность LCDR1 представлена SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность LCDR2 представлена SEQ ID NO: 5 и аминокислотная последовательность LCDR3 представлена SEQ ID NO: 6.
2. Антитело по п. 1, содержащее HCVR и LCVR, где аминокислотная последовательность HCVR представлена SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность LCVR представлена SEQ ID NO: 8.
3. Антитело по п. 2, отличающееся тем, что Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 7 представляет собой глутамин.
4. Антитело по п. 2, отличающееся тем, что Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 7 представляет собой пироглутаминовую кислоту.
5. Антитело по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что указанное антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов.
6. Антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой агонистическое антитело к CD200R.
7. Антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что указанное антитело связывает по меньшей мере один из Fcγ RI, Fcγ RIIA_{131H}, Fcγ RIIA_{131R}, Fcγ RIIb и Fcγ RIIIA_{158V}.
8. Антитело по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что это указанное антитело связывает по меньшей мере два из Fcγ RI, Fcγ RIIA_{131H}, Fcγ RIIA_{131R}, Fcγ RIIb и Fcγ RIIIA_{158V}.
9. Антитело по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело связывает по меньшей мере три из Fcγ RI, Fcγ RIIA_{131H}, Fcγ RIIA_{131R}, Fcγ RIIb и Fcγ RIIIA_{158V}.

10. Антитело по любому из пп. 1-9, отличающееся тем, что указанное антитело связывает по меньшей мере четыре из Fc γ RI, Fc γ RIIA_131H, Fc γ RIIA_131R, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIA_158V.
- 5 11. Антитело по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что указанное антитело связывает Fc γ RI, Fc γ RIIA_131H, Fc γ RIIA_131R, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIA_158V.
12. Антитело по любому из пп. 1-11, отличающееся тем, что указанное антитело связывает Fc γ RI с аффинностью связывания от примерно 70 пМ до примерно 500 пМ.
- 10 13. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что указанное антитело связывает Fc γ RIIA_131H с аффинностью связывания от примерно 2 мкМ до примерно 5 мкМ.
14. Антитело по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что указанное антитело связывает Fc γ RIIA_131R с аффинностью связывания от примерно 1 мкМ до
15 примерно 5 мкМ.
15. Антитело по любому из пп. 1-14, отличающееся тем, что указанное антитело связывает Fc γ RIIb с аффинностью связывания от примерно 1 мкМ до примерно 4 мкМ.
16. Антитело по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что указанное антитело связывает Fc γ RIIIA_158V с аффинностью связывания от примерно 1 мкМ
20 до примерно 6 мкМ.
17. Антитело по любому из пп. 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело также связывает Fc γ RIIIA_158F с аффинностью связывания более 9 мкМ.
18. Антитело по любому из пп. 7-17, отличающееся тем, что значения
25 аффинности связывания составляют:
- (i) от примерно 70 пМ до примерно 500 пМ в отношении Fc γ RI;
 - (ii) от примерно 2 мкМ до примерно 5 мкМ в отношении Fc γ RIIA_131H;
 - (iii) от примерно 1 мкМ до примерно 5 мкМ в отношении Fc γ RIIA_131R;
 - 30 (iv) от примерно 1 мкМ до примерно 4 мкМ в отношении Fc γ RIIb;
 - (v) от примерно 1 мкМ до примерно 6 мкМ в отношении Fc γ RIIIA_158V; и
 - (vi) более 9 мкМ в отношении Fc γ RIIIA_158F.

19. Антитело по любому из пп. 7-18, отличающееся тем, что значения аффинности связывания составляют:
- (i) примерно 400 пМ в отношении Fc γ RI;
 - (ii) примерно 4 мкМ в отношении Fc γ RIIA_131H;
 - 5 (iii) примерно 2 мкМ в отношении Fc γ RIIA_131R;
 - (iv) примерно 2 мкМ в отношении Fc γ RIIb;
 - (v) примерно 4 мкМ в отношении Fc γ RIIIA_158V; и
 - (vi) более 10 мкМ в отношении Fc γ RIIIA_158F.
20. Антитело по любому из пп. 12-19, отличающееся тем, что аффинность связывания определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.
21. Антитело по любому из пп. 1-20, отличающееся тем, что указанное антитело не связывает C1q.
22. Антитело по п. 21, отличающееся тем, что связывание с C1q определяют 15 путем ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа).
23. Антитело по любому из пп. 1-22, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG4P.
24. Антитело по п. 1 или п. 2, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), при этом аминокислотная последовательность HC представлена SEQ ID NO: 9 и аминокислотная последовательность LC представлена SEQ ID NO: 10.
- 20
25. Антитело по п. 24, отличающееся тем, что Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глутамин, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глицин.
- 25
26. Антитело по п. 24, отличающееся тем, что Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой пироглутаминовую кислоту, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глицин.
27. Антитело по п. 24, отличающееся тем, что Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой глутамин, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 отсутствует.
- 30
28. Антитело по п. 24, отличающееся тем, что Хаа в положении 1 в SEQ ID NO: 9 представляет собой пироглутаминовую кислоту, и Хаа в положении 446 в SEQ ID NO: 9 отсутствует.

29. Агонистическое антитело к CD200R, отличающееся тем, что указанное антитело не вызывает значительного высвобождения цитокинов по сравнению с антителом IgG1 дикого типа, содержащим такие же CDR, что и указанное агонистическое антитело к CD200R.
- 5 30. Антитело по п. 29, содержащее переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR), где указанная HCVR содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где аминокислотная последовательность HCDR1 представлена SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 представлена SEQ ID NO: 2 и аминокислотная последовательность HCDR3 представлена SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность LCDR1 представлена SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность LCDR2 представлена SEQ ID NO: 5 и аминокислотная последовательность LCDR3 представлена SEQ ID NO: 6, и где связывание антитела с Fc γ RI, Fc γ RIIA_{131H}, Fc γ RIIA_{131R}, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIA_{158V}, Fc γ RIIIA_{158F} или C1q не вызывает значительного высвобождения цитокинов по сравнению с антителом IgG1 дикого типа, содержащим такие же CDR, что и указанное агонистическое антитело к CD200R.
- 10
- 15
31. Антитело по любому из пп. 29-30, отличающееся тем, что указанное антитело не связывает Fc γ RIIIA_{158F} или C1q.
- 20
32. Способ лечения пациента, имеющего заболевание, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, астму, атопический дерматит или другие воспалительные заболевания, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-31.
- 25
33. Антитело по любому из пп. 1-31 для применения в терапии.
34. Антитело по любому из пп. 1-31 для применения в лечении заболевания, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, атопический дерматит, астму или воспалительное заболевание.
- 30
35. Применение антитела по любому из пп. 1-31 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, где указанное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, аллергическое

заболевание, астму, атопический дерматит или другие воспалительные заболевания.

- 5
36. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-31 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.
- 10
37. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий НС, аминокислотная последовательность которой представлена SEQ ID NO: 9, или полинуклеотид, кодирующий LC, аминокислотная последовательность которой представлена SEQ ID NO: 10.
- 15
38. Молекула ДНК по п. 37, в которой последовательность полинуклеотида, кодирующего НС, представлена SEQ ID NO: 12, или последовательность полинуклеотида, кодирующего LC, представлена SEQ ID NO: 13.
- 20
39. Молекула ДНК по п. 37, содержащая 1) полинуклеотид, кодирующий НС, аминокислотная последовательность которой представлена SEQ ID NO: 9, и 2) полинуклеотид, кодирующий LC, аминокислотная последовательность которой представлена SEQ ID NO: 10.
- 25
40. Молекула ДНК по п. 39, отличающаяся тем, что последовательность полинуклеотида, кодирующего НС, представлена SEQ ID NO: 12 и последовательность полинуклеотида, кодирующего LC, представлена SEQ ID NO: 13.
- 30
41. Клетка млекопитающего, трансформированная молекулой ДНК по п. 40, при этом указанная трансформированная клетка млекопитающего способна экспрессировать антитело, содержащее две НС и две LC, где аминокислотная последовательность каждой НС представлена SEQ ID NO: 9 и аминокислотная последовательность каждой LC представлена SEQ ID NO: 10.