

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044791**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.29(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)(21) Номер заявки
202091563(22) Дата подачи заявки
2019.01.24**(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА**(31) **62/622,480**(32) **2018.01.26**(33) **US**(43) **2020.10.08**(86) **PCT/US2019/015029**(87) **WO 2019/147867 2019.08.01**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**(72) Изобретатель:
**Перселл Лиза А., Вье Джонатан,
Олсон Уильям (US)**(74) Представитель:
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Гизатуллина
Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф., Парамонова К.В. (RU)**(56) **WO-A1-2015051010****WO-A1-2016164835****EP-A1-3011968**

EKIERT DAMIAN C ET AL: "A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses", SCIENCE, AAAS, AMERICAN ASSOC. FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 333, no. 6044, 12 August 2011 (2011-08-12), pages 843-850, XP002711145, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1204839 figure 4; table 1 -& EKIERT D C ET AL: "Supporting Online Material; A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses", SCIENCE, AAAS, AMERICAN ASSOC. FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, 12 August 2011 (2011-08-12), pages 1-60, XP002725406, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1204839 Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencemag.org/content/333/6044/843/suppl/DC1 [retrieved on 2011-07-07] the whole document

WO-A2-2015120097**WO-A1-2017192589****EP-A1-2380976****WO-A2-2016100807**

(57) Настоящее изобретение предусматривает моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с белком, представляющим собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа, фармацевтические композиции, содержащие антитела, и способы применения. Антитела по настоящему изобретению применимы для подавления или нейтрализации активности вируса гриппа, обеспечивая таким образом средство для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа у людей. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение одного или более антител, которые связываются с НА вируса гриппа для предотвращения прикрепления и/или проникновения вируса в клетки-хозяева. Антитела по настоящему изобретению можно применять с профилактической или терапевтической целью, и их можно применять отдельно или в комбинации с одним, или более другими противовирусными средствами или вакцинами.

B1**044791****044791 B1**

Область техники изобретения

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США под серийным №62/622480; поданной 26 января 2018 года; которая включена в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме.

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) группы 2 вируса гриппа А, композициям, содержащими эти антитела, а также терапевтическим и диагностическим путям применения этих антител.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей отправлена одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием "10201WO01_SEQ_LIST.txt", дата создания 24 января, 2019 года, и размером приблизительно 21 кб. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки в его полном объеме.

Предпосылки изобретения

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

Вирусы гриппа состоят из трех типов А, В и С. Кроме того, вирусы гриппа А могут быть классифицированы на подтипы на основе аллельных изменений в антигенных участках двух генов, которые кодируют поверхностные гликопротеины, гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА), которые необходимы для прикрепления и проникновения вируса в клетку-хозяина.

Гемагглютинин представляет собой трехмерный гликопротеин, который содержит два структурных домена: глобулярный домен головки, который состоит из рецептор-связывающего участка (который подвергается частому антигенному дрейфу), и стебель (более консервативный среди различных штаммов вируса гриппа). Белок НА синтезируют в виде предшественника (НА0), который подвергается протеолитической обработке с получением двух субъединиц (НА1 и НА2), которые ассоциируются друг с другом с образованием структуры в виде стебля/глобулярной головки. Пептид НА1 отвечает за прикрепление вируса к клеточной поверхности. Пептид НА2 образует стержнеобразную структуру, которая опосредует слияние вирусных и клеточных мембран в эндосомах, обеспечивая высвобождение комплекса рибонуклеиновой кислоты в цитоплазму.

В настоящее время существует восемнадцать подтипов, определяемых их белками гемагглютинина (Н1-Н18). 18 НА можно разделить на две группы. Группа 1 состоит из подтипов Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17 и Н18, и группа 2 включает подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15.

Новые штаммы одного и того же подтипа могут возникать в результате явления, называемого антигенным дрейфом, или мутаций молекул НА или NA, которые создают новые и различные эпитопы. Следствием этого является то, что новую вакцину необходимо получать каждый год против вирусов, которые, по прогнозам, появятся - способ который не только дорогостоящий, но и крайне неэффективный. Несмотря на то, что технологические разработки улучшали способность вырабатывать улучшенный(-е) антиген(-ы) гриппа для вакцинных композиций, остается потребность в обеспечении дополнительных источников защиты для борьбы с возникающими подтипами и штаммами гриппа.

Хотя идея создания вакцинной композиции, содержащей антиген, представляющий интерес (например, НА и/или NA), для создания широко нейтрализующих антител у пациента, как правило, считают хорошим подходом, поэтому не всегда желательно использовать этот подход в определенных популяциях пациентов. Например, у определенных пациентов вакцинная композиция, содержащая представляющий интерес антиген, не всегда может быть эффективной, как например, у пожилых, у очень молодых, у иммунокомпрометированных пациентов и т. д. В этих популяциях пациентов или у любого пациента, не способного к закреплению эффективного иммунного ответа, может быть более предпочтительным обеспечение композиции, уже содержащей широко нейтрализующие антитела, которые могут нацеливаться на эпитопы, общие для ряда штаммов в группе 1 и/или подтипах группы 2.

На сегодняшний день достигнут ограниченный успех в идентификации таких антител, которые широко нейтрализуют или подавляют вирусы гриппа. Okuno et al. иммунизировали мышью вирусом гриппа A/Okuda/57 (H2N2) и выделили антитело, обозначенное C179, которое связано с консервативным конформационным эпитопом в НА2 и нейтрализовало вирусы гриппа А подтипов Н2, Н1 и Н5 группы 1 in vitro и in vivo (Okuno et al. (1993) J. Virol. 67(5):2552-2558). Throsby et al. идентифицировали 13 моноклональных антител из человеческих В-клеток, которые имели широкий спектр активности против подтипов группы 1 (Throsby et al. (2008), PLOS one 3(2):e3942). Sui et al. идентифицировали человеческое моноклональное антитело (F10), которое связывает Н5 и другие вирусы группы 1 (Sui, et al. (2009), Nat. Struct. Mol. Biol. 16(3):265-273). Tharakaraman et al. идентифицировали широко нейтрализующее антитело, обозначаемое VIS410, которое было эффективно в нейтрализации штаммов группы 2 вируса гриппа, включая штаммы Н3N2 и Н7N9, in vitro и in vivo (Tharakaraman, K, et al., (2015), Proc Natl Acad Science 112 (35): 10890-10895).

Однако после десятилетий исследований в данной области лишь несколько антител в настоящее время проходят клинические испытания для оценки их способности к нейтрализации вирусов гриппа разных подтипов (см., например, антитела, разрабатываемые Scacell Holland ((US2012/0276115, US2014/0065156, US8470327, US2014/0120113, EP2731967, US8691223, US2013/0243792, US2014/0065165, WO2008/028946 и WO2010/130636); Университет Осаки (US2011/0319600, EP2380976, US2012/0058124, US2012/0058124), Celltrion (US2013/0004505, EP2545074; WO2014/158001); Университет Вандербильта (US2013/0289246), SeaLane Biotechnologies (US2012/0128671), Trellis Bioscience, Inc. (US2012/0020971 EP2582721); Visterra, Inc. (US2013/0302349); Burnham Institute/Dana Farber (US2014/011982, EP2222701, WO2010/027818); Temasek (US8444986, US8574581, US 8637644, US8637645, US8383121, US8540996, US8574830, US8540995); HUMABS Biosciences/Институт для исследований в биомедицине (US8871207, US8685402, EP2313433); MedImmune (WO2015/051010); AIMM Therapeutics (WO2013/081463, EP12798020) и Genentech (US2014/0161822), однако до сих пор нет представленных на рынке антител, которые широко нейтрализуют или подавляют инфекцию вируса гриппа А или ослабляют заболевание, вызываемое различными подтипами этого вируса. Соответственно, в данной области техники все еще существует потребность в идентификации новых антител, которые нейтрализуют несколько подтипов вируса гриппа А, которые можно использовать для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают гемагглютинин (НА) группы 2 вируса гриппа А. Антитела по настоящему изобретению применимы, среди прочего, для подавления или нейтрализации активности НА группы 2 вируса гриппа А. В некоторых вариантах осуществления антитела применимы для блокирования прикрепления вируса гриппа к клетке-хозяину и/или для предупреждения проникновения вируса гриппа в клетки-хозяева. В некоторых вариантах осуществления функция антител проявляется в подавлении передачи вируса между клетками. В определенных вариантах осуществления антитела применяют в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции вируса гриппа у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитела можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту, имеющему инфекцию вирусом гриппа или подверженному ее возникновению. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить субъекту, которому вакцина противопоказана, или для которого вакцина является менее эффективной, например, пожилой пациент, очень молодой пациент, пациент, у которого может быть аллергия на один или более компонентов вакцины, или иммунокомпрометированный пациент, который может не реагировать на иммуногены в вакцине. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить медицинскому персоналу, госпитализированным пациентам или лицам, проживающим в доме престарелых, или другим пациентам с высоким риском во время вспышки гриппа. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить в качестве первой линии лечения пациентам, в случае если прогнозируемая ежегодная вакцина неэффективна, или в случае пандемии со штаммом, который подвергся серьезному антигенному воздействию.

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

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) группы 2 вируса гриппа А.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с НА группы 2 вируса гриппа А, где антитело имеет две или более из следующих характеристик:

- (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- (b) связывается с НА группы 2 вируса гриппа А с константой диссоциации (K_D), составляющей менее 10^{-8} М, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) демонстрирует диссоциативный период полужизни ($t^{1/2}$), составляющий более 75 минут;
- (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов гриппа А группы 2, выбранных из штаммов H3N2 и H7N9, характеризующуюся показателем IC_{50} , составляющим соответственно менее 200 нМ и 500 нМ;
- (e) демонстрирует комплемент-опосредованный лизис инфицированных вирусом гриппа клеток, характеризующийся показателем EC_{50} , составляющим менее приблизительно 150 нМ;
- (f) демонстрирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении инфицированных вирусом клеток-мишеней при использовании репортерного биоанализа, характери-

зующуюся показателем EC_{50} , составляющим менее приблизительно 0,9 нМ;

(g) демонстрирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении инфицированных вирусом клеток-мишеней в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), характеризующуюся показателем EC_{50} , составляющим менее приблизительно 0,180 нМ;

(h) демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, при введении через 24, 48, 72 или 96 часов после заражения вирусом;

(i) демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, при введении в комбинации с озельтамивиром через 96 часов после инфицирования; или

(j) где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность участка тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах какой-либо из последовательностей переменного участка тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в табл. 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах какой-либо из последовательностей переменного участка легкой цепи (LCVR), перечисленных в табл. 1.

В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению демонстрирует усиление защитной функции при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы, составляющей от приблизительно 7 до 15 мг/кг, начиная с дня 3 после инфицирования, по сравнению с пероральным введением озельтамивира, вводимым два раза в день в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг, начиная с дня 3 после инфицирования (и продолжающимся до дня 7 после инфицирования).

В связанном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению обеспечивает усиление защитной функции у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении либо подкожно, либо внутривенно, и/или при введении перед инфекцией или после инфицирования вирусом гриппа.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению демонстрирует усиление защитной функции по сравнению с животным, которому вводят контрольное антитело изотипического (отрицательного) контроля, при введении инфицированному млекопитающему в виде однократной подкожной или внутривенной дозы в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

В одном варианте осуществления, антитело по настоящему изобретению демонстрирует усиление защитной функции при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы, составляющей от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, по сравнению с пероральным введением озельтамивира, вводимым два раза в день в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению демонстрирует уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 15 мг/кг, через 24 часа или более после инфицирования.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению демонстрирует уровень выживаемости, составляющий 100%, у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы приблизительно 15 мг/кг через 24, 48, 72 или 96 часов после инфицирования.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению демонстрирует уровень выживаемости, составляющий приблизительно 100%, у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении в виде однократной внутривенной дозы приблизительно 15 мг/кг по сравнению с уровнем выживаемости 80%, наблюдаемым с озельтамивиром, при пероральном введении два раза в день в течение 5 дней при дозе приблизительно 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению обеспечивает дополнительный защитный эффект у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении совместно с озельтамивиром в течение более 48 часов после инфицирования.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению обеспечивает дополнительный защитный эффект у млекопитающего, инфицированного вирусом гриппа, при введении совместно с озельтамивиром через 72 часа после инфицирования.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению обеспечивает дополнительный защитный эффект при применении в комбинации с озельтамивиром, когда антитело вводят млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы в диапазоне от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, и озельтамивир вводят перорально два раза в день в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг.

В связанном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению обеспечивает дополнительный защитный эффект при применении в комбинации с озельтамивиром через 96 часов после инфицирования вирусом гриппа, где антитело вводят в виде однократной внутривенной дозы в диапазоне от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, и озельтамивир вводят перорально два раза в день в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить внутривен-

но, интраназально, подкожно, интрадермально или внутримышечно, и озельтамивир можно вводить перорально.

В одном варианте осуществления озельтамивир вводят до введения антитела по настоящему изобретению, одновременно с ним или после него.

В одном варианте осуществления антитело и/или озельтамивир можно вводить в виде однократной дозы или в виде нескольких доз.

Иллюстративные антитела к HA группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 данного документа. В таблице 1 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR), переменных участков легкой цепи (LCVR), определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к HA вируса гриппа. В табл. 2 изложены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к HA вируса гриппа.

Настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или фактически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают HA группы 2 вируса гриппа А, содержащую HCVR, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или 18.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают HA группы 2 вируса гриппа А, содержащую LCVR, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или 26.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает HA группы 2 вируса гриппа А, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 или 18/26.

В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H14611N2) или 18/26 (например, H1H14612N2).

В одном варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 или 20;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 или 22;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 или 24;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 или 28;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 или 30; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 или 32.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает HA группы 2 вируса гриппа А, содержит (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 4, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 6; (c) HCDR3 из SEQ ID NO: 8; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 12; (e) LCDR2 из SEQ ID NO: 14 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает HA группы 2 вируса гриппа А, содержит (a) HCDR1 из SEQ ID NO: 20, (b) HCDR2 из SEQ ID NO: 22; (c) HCDR3 из SEQ ID NO: 24; (d) LCDR1 из SEQ ID NO: 28; (e) LCDR2 из SEQ ID NO: 30 и (f) LCDR3 из SEQ ID NO: 32.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по от-

ношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в иллюстративных антителах к HA группы 2 вируса гриппа А, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, H1H14611N2) или 24/32 (например, H1H14612N2).

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат группу из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к HA группы 2 вируса гриппа А, перечисленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, H1H14611N2) или SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32 (например, H1H14612N2).

В связанном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено для любого из иллюстративных антител к HA группы 2 вируса гриппа А, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H14611N2) или SEQ ID NO: 18/26 (например, H1H14612N2). Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариативности последовательности, определение согласно Chothia основано на местоположении структурных участков петли, и определение

согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. См., например, "Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997) и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с HA группы 2 вируса гриппа А, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR, состоящие из CDR в HCVR и CDR в LCVR, где каждая из них имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с HA группы 2 вируса гриппа А или которые связывают тот же эпитоп на HA группы 2 вируса гриппа А, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR из HCVR и CDR из LCVR, где каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют присоединение к HA группы 2 вируса гриппа А и/или проникновение в клетку-хозяина.

В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими, включающими первую специфичность связывания с первым эпитопом в HA группы 2 вируса гриппа А и вторую специфичность связывания с другим антигеном.

Во втором аспекте настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к HA группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению или их части. Например, настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность,

выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено с помощью любого из иллюстративных антител к HA вируса гриппа, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено с помощью любого из иллюстративных антител к HA вируса гриппа, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по сути аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ней. В определенных вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR получены из одного и того же антитела к HA группы 2 вируса гриппа А, приведенного в табл. 1.

Настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие какую-либо из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в табл. 1. Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие какую-либо из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в табл. 1.

В связанном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к HA группы 2 вируса гриппа А. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновых кислот, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены векторы экспрессии, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

В третьем аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают HA группы 2 вируса гриппа А, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, которая представляет собой комбинацию антитела к HA группы 2 вируса гриппа А и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое преимущественно комбинируется

с антителом к НА группы 2 вируса гриппа А. Иллюстративные средства, которые можно преимущественно комбинировать с антителом к НА группы 2 вируса гриппа А, включают без ограничения другие средства, которые связывают и/или подавляют активность НА вируса гриппа (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.) и/или средства, которые непосредственно не связывают НА вируса гриппа, однако тем не менее подавляют вирусную активность, в том числе инфекционность клеток-хозяев. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: (а) первое антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент; (б) второе антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело связывается с первым эпитопом на НА группы 2 вируса гриппа А, и второе антитело связывается со вторым эпитопом на НА группы 2 вируса гриппа А, где первый и второй эпитопы отличаются и не перекрываются; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: (а) первое антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент; (б) второе антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело не конкурирует перекрестно со вторым антителом для связывания с НА группы 2 вируса гриппа А; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: (а) первое антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент; (б) второе антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с другим вирусным (не принадлежащим к вирусу гриппа) антигеном, где первое антитело связывается с эпитопом НА группы 2 вируса гриппа А, и второе антитело связывается с эпитопом на другом вирусном (не принадлежащем к вирусу гриппа) антигене; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: (а) первое антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент; (б) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые взаимодействуют с другим антигеном, где первое антитело связывается с эпитопом НА группы 2 вируса гриппа А, и второе антитело связывается с эпитопом на другом антигене; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Дополнительные комбинированные терапевтические препараты и комбинированные составы, включающие антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению, раскрыты в других частях данного документа.

В четвертом аспекте настоящее изобретение предусматривает терапевтические способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированные с НА группы 2 вируса гриппа А (такого как вирусная инфекция у субъекта), или по меньшей мере один симптом, ассоциированный с вирусной инфекцией, с применением антитела к НА группы 2 вируса гриппа А или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению, где терапевтические способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или острое состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем подавления активности НА вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома инфекции вирусом гриппа А, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к НА вируса гриппа или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы облегчения или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции вирусом гриппа у субъекта путем введения антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из головной боли, лихорадки, продолжительной боли, ринореи (заложенности носа), озноба, усталости, слабости, боли в горле, кашля, одышки, рвоты, диареи, пневмонии, бронхита и смерти.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы снижения вирусной нагрузки у субъекта, при этом способы включают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, которые связывают НА группы 2 вируса гриппа А и блокируют связывание с вирусом гриппа и/или проникновение в клетку-хозяина.

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

нарушением. Другие субъекты, подверженные риску инфекции вирусом гриппа, включают взрослых людей пожилого возраста (в возрасте старше 65 лет), детей в возрасте младше 2 лет, работников сферы здравоохранения и людей основными патологическими состояниями, такими как легочная инфекция, сердечное заболевание или формы диабета. Также любой человек, который вступает в физический контакт или близко физически расположен к инфицированному человеку, имеет повышенный риск развития инфекции вирусом гриппа. Кроме того, субъект подвержен риску заражения инфекцией вирусом гриппа из-за близости к вспышке заболевания, например, находится в плотно заполненном городе или в непосредственной близости от субъектов, у которых имеются подтвержденные или предполагаемые инфекции вирусом гриппа, или выбора места работы, например, работник больницы, фармацевтический исследователь, путешественник в инфицированную область или часто летающий пассажир.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные средства), противоинфекционного лекарственного средства, другого антитела к НА вируса гриппа, антитела к другому антигену гриппа (например, нейраминидаза), противовирусного лекарственного средства, противозастойного лекарственного средства, антигистамина, вакцины против гриппа, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, и любого другого лекарственного средства или терапевтического препарата, известных из уровня техники, применимых для уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции вирусом гриппа или для снижения вирусной нагрузки у пациента. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое способствует нейтрализации или снижению любых возможных побочных эффектов, ассоциированных с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, если такой(-ие) эффект(-ы) должен(-ны) возникать. Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутривожно, внутривентриально, перорально, интраназально, внутримышечно или интракраниально. В одном варианте осуществления антитело можно вводить посредством одной внутривенной инфузии для достижения максимальной концентрации антитела в сыворотке крови субъекта. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг веса тела до приблизительно 100 мг/кг веса тела субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить в одной или более дозах, содержащих от 50 мг до 5000 мг.

Настоящее изобретение также включает применение антитела к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению для лечения заболевания или нарушения, при которых блокирование связывания НА вируса гриппа и/или его активности могло бы принести пользу. Настоящее изобретение также включает применение антитела к НА группы 2 вируса гриппа А или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, при которых блокирование связывания НА вируса гриппа и/или его активности могло бы принести пользу.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А, 1В, 1С: показано, что однократная доза Н1Н14611Н2 и Н1Н14612Н2 эффективно нейтрализует три разных штамма вирусов гриппа А группы 2 *in vitro*. 1А: А/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2); 1В: А/Philippines/01/1982 (H3N2) и 1С: А/Shanghai/01/2013-PR8 (H7N9).

Фиг. 2: показано, что Н1Н14611Н2 и Н1Н14612Н2 опосредуют комплемент-зависимую цитотоксичность клеток, инфицированных А/Aichi/02/1968-PR8-X31.

Фиг. 3: показана кривая зависимости доза-ответ для антител к НА группы 2 Н1Н14611Н2 и Н1Н14612Н2 в анализе активации FcγR1IA.

Фиг. 4: показана кривая зависимости доза-ответ для антител к НА группы 2 Н1Н14611Н2 и Н1Н14612Н2 в анализе ADCC с использованием человеческих донорных РВМС.

Фиг. 5А, 5В, 5С: показано, что однократная доза антител к НА группы 2 Н1Н14611Н2 и Н1Н14612Н2 демонстрирует полную защиту против летального вируса гриппа при введении в виде однократной дозы, составляющей 15 мг/кг, через 24 (А), 48 (В) или 72 (С) часа после инфицирования 5 X MLD50 А/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2).

Фиг. 6: показано, что антител к НА группы 2 Н1Н14611Н2 обладает аддитивным эффектом в отношении лечения инфекции вирусом гриппа при введении в комбинации с озельтамивиром через 96 часов после инфицирования.

Подробное описание изобретения

Перед описанием способов настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

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

Определения

Термин "гемагглютинин вируса гриппа", также называемый "НА вируса гриппа", представляет собой трехмерный гликопротеин, находящийся на поверхности вирионов гриппа, который опосредует присоединение вируса (посредством связывания HA1 с α -2,3- или α -2,6-сиаловыми кислотами) и проникновение (посредством конформационного изменения) в клетки-хозяева. НА состоит из двух структурных доменов: глобулярного домена головки, содержащего рецептор-связывающий участок (подвержен высокой частоте антигенных мутаций) и участка стебля (более консервативный среди различных штаммов вируса гриппа). НА вируса гриппа синтезируется в виде предшественника (HA0), который подвергается протеолитической обработке с получением двух субъединиц (HA1 и HA2), которые ассоциируются друг с другом с образованием структуры в виде стебля/глобулярной головки. Вирусный НА является наиболее вариабельным антигеном на вирусе (18 подтипов можно разделить на две группы), но стебель (HA2) является высококонсервативным в каждой группе.

Аминокислотная последовательность полноразмерного НА вируса гриппа проиллюстрирована аминокислотной последовательностью H3N2A/Wisconsin/67/X-161/2005, представленной в GenBank под номером доступа ACF41911.1 (также показана в данном документе как SEQ ID NO: 33), или H7N7A/chicken/Netherlands/01/2003, номер доступа AAR02640.1 (также показана в данном документе как SEQ ID NO: 34). Термин "НА вируса гриппа" также включает варианты белков НА вируса гриппа, выделенные из разных изолятов гриппа. Термин "НА вируса гриппа" также включает рекомбинантный НА или его фрагмент. Термин также охватывает НА вируса гриппа или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью.

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

Термин "антитело", используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. "молекул полного антитела"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного участка тяжелой цепи ("HCVR" или "VH") и константного участка тяжелой цепи ("LCVR" или "VL") и константного участка легкой цепи (C_L). Участки V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающий фрагмент) могут быть идентичными последовательностям зародышевого типа человека или могут быть естественно или искусственно изменены. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или более CDR.

Также возможны замена одного или более остатков CDR или удаление одного или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых можно обойтись для связывания без одной или двух CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали участки контакта между антителами и их антигенами, исходя из опубликованных кристаллических структур, и сделали заключение, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не имеют аминокислотных остатков, вступающих в контакт с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, которые не вступают в контакт с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не нужны) среди CDR-участков согласно Kabat, находящихся за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. При удалении CDR или его остатка(-ов) они обычно заменяются на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирическим путем. Эмпири-

ческие замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрытые в данном документе полностью человеческие моноклональные антитела к НА вируса гриппа могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевого типа. Такие мутации можно легко определить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевого типа, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из каких-либо аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или несколько аминокислот в пределах одного или нескольких каркасных участков и/или участков CDR мутированы в соответствующий(-е) остаток(-ки) последовательности зародышевого типа, из которой получено антитело, или в соответствующий(-е) остаток(-ки) последовательности другого зародышевого типа, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего(-их) остатка(-ков) зародышевого типа (такие изменения последовательностей называются в данном документе собирательно как "мутации зародышевого типа"). Специалист в данной области техники, исходя из раскрытых в данном документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевого типа или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасных участков и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно с получением остатков, встречающихся в первоначальной последовательности зародышевого типа, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутированы обратно с получением первоначальной последовательности зародышевого типа, например, только мутированные остатки, находящиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасных участков и/или CDR мутированы в соответствующий(-ие) остаток(-ки) другой последовательности зародышевого типа (т.е. последовательности зародышевого типа, которая отличается от последовательности зародышевого типа, из которой первоначально было получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать какую-либо комбинацию из двух или более мутаций зародышевого типа в каркасных участках и/или участках CDR, например, где определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток последовательности определенной зародышевого типа, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от последовательности исходной зародышевого типа, сохраняются или мутированы в соответствующий остаток последовательности другого зародышевого типа. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевого типа, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичности связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные биологические антагонистические или агонистические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п. Настоящее изобретение охватывает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа.

Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные антитела к НА вируса гриппа, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к НА вируса гриппа с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

Термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные участки, полученные из последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевого типа человеческого иммуноглобулина (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенозом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например в CDR, и в частности CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего (например, мыши), привиты на FR последовательности человека. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у млекопитающего, не относящегося к человеку, или в клетках млекопитающего, не относящегося к человеку. Термин не подразумевает включение антител, выделенных из человека-субъекта или полученных от него.

Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, которые созданы, экспрессированы, выделены или получены с помощью технологий или способов, известных из уровня техники, как например, технология рекомбинантной ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не относящегося к человеку

(в том числе у трансгенных млекопитающих, не относящихся к человеку, например, трансгенных мышей), или в клеточной системе экспрессии (например, клетках CHO), или они выделены из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

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

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем mAb, которые характеризуются аффинностью связывания с НА вируса гриппа, выраженной в виде K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, как измерено с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии, например, биосенсор Octet® HTX, или с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или с помощью определения аффинности в растворе с использованием ELISA.

Под терминами "медленная скорость диссоциации", "Koff" или "kd" подразумевается антитело, которое диссоциирует из НА вируса гриппа с константой скорости 1×10^{-3} с⁻¹ или меньше, предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или меньше, как определено с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии, например биодатчик Octet® HTX, или поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

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

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с функциональной молекулой, такой как лиганд, или терапевтической молекулой ("иммуноконъюгатом"), такой противовирусное лекарственное средство, второе антитело к вирусу гриппа или любая другая терапевтическая молекула, применимая в лечении инфекции, вызываемой вирусом гриппа.

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

Термины "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело", используемые в данном документе (или "антитело, которое нейтрализует активность НА вируса гриппа" или "антитело-антагонист"), предназначены для обозначения антитела, связывание которого с антителом к НА вируса гриппа приводит в результате к подавлению по меньшей мере одной биологической активности НА вируса гриппа. Например, антитело по настоящему изобретению может предупреждать или блокировать присоединение вируса гриппа или проникновение его в клетку-хозяина. Кроме того, "нейтрализующее антитело" представляет собой такое, которое может нейтрализовывать, т.е. предупреждать, подавлять, уменьшать, препятствовать или мешать способности патогена инициировать и/или обеспечивать инфицирование у хозяина. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" используются в данном документе взаимозаменяемо. Эти антитела можно применять отдельно или в комбинации в качестве профилактических или терапевтических средств с другими противовирусными средствами при надлежащем составе, или в связи с активной вакцинацией, или в качестве диагностического инструмента.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое предусматривает анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискаутауэй, Нью-Джерси, США).

Биослойная интерференция представляет собой безметочную технологию для измерения биомолекулярных взаимодействий. Это оптическая аналитическая методика, которая анализирует схему интерференции белого света, отраженного от двух поверхностей: слоя иммобилизованного белка на наконечнике биодатчика и внутреннего эталонного слоя. Любое изменение количества молекул, связанных с наконечником биосенсора, вызывает сдвиг схемы интерференции, которая может быть измерена в реальном времени (Abdiche, Y.N., et al. *Analytical Biochemistry*, (2008), 377(2), 209-217). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения для оценки связывающих характеристик определенных антител к НА вируса гриппа применяли "биодатчик (анализ Octet HTX) на основе биослойной интерферометрии в реальном времени".

Используемый в данном документе термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

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

Термин "перекрестно конкурирует", используемый в данном документе, означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном и подавляют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию двух антител в обоих направлениях, т.е. первое антитело, которое связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с разными, но не перекрывающимися эпитопами таким образом, что связывание одного подавляет или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерического несоответствия. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью известных из уровня техники способов, например, с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии. Для определения того, конкурирует ли перекрестно тестовое антитело с эталонным антителом к белку группы 2 вируса гриппа по настоящему изобретению, эталонному антителу дают возможность связываться с НА или пептидом вируса гриппа в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с НА вируса гриппа. Если тестовое антитело способно связываться с НА вируса гриппа после насыщения связывания с помощью эталонного антитела к НА вируса гриппа, можно сделать вывод, что тестовое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело к НА вируса гриппа. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с НА вируса гриппа после насыщения связывания с помощью эталонного антитела к НА вируса гриппа, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом в качестве эпитопа, который связан с эталонным антителом к НА вируса гриппа по настоящему изобретению.

Термин "идентичность по сути" или "по сути идентичный" по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой последовательностью нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична молекуле эталонной нуклеиновой кислоты, может в ряде случаев кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый молекулой эталонной нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "сходство по сути" или "по сути сходный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с использованием значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен дру-

гим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена по сути не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, - процент или степень аналогичности можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, которая включена в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение с неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с помощью измерений сходства, присвоенного различным заменам, делениям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и расчет процента идентичности последовательностей в областях с наибольшим перекрытием между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое приводит к требуемому эффекту, ради которого его вводят.

Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в уменьшении тяжести, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Субъект может иметь инфекцию вирусом гриппа или он может быть предрасположен к развитию инфекции вирусом гриппа. Субъекты, "предрасположенные к развитию инфекции вирусом гриппа", или пациенты, "которые могут находиться под повышенным риском инфекции вирусом гриппа", являются субъектами с ослабленной иммунной системой вследствие аутоиммунного заболевания, людей, получающих иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органов), людей, пораженных синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), с определенными формами анемии, которые истощают или разрушают белые кровяные тельца, тех людей, которые получают лучевую или химиотерапию, или тех людей, которые страдают воспалительным нарушением. Кроме того, под повышенным риском находится субъект чрезвычайно молодого или старшего возраста. Любой человек, который вступает в физический контакт или близко физически расположен к инфицированному человеку, имеет повышенный риск развития инфекции вирусом гриппа. Кроме того, субъект подвержен риску заражения инфекцией вирусом гриппа из-за близости к вспышке заболевания, например, находится в плотно заполненном городе или в непосредственной близости от субъектов, у которых имеются подтвержденные или предполагаемые инфекции вирусом гриппа, или выбора места работы, например, работник больницы, фармацевтический исследователь, путешественник в инфицированную область или часто летающий пассажир.

Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к снижению или уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфек-

ции вирусом гриппа вследствие введения терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. Термины включают подавление прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. у субъекта может отсутствовать инфекция или у него могут быть снижены или отсутствовать вирусные титры при введении терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Термины "предупредить", "предупреждающий" или "предупреждение" относятся к подавлению проявления инфекции вирусом гриппа или любых симптомов или признаков инфекции вирусом гриппа при введении антитела по настоящему изобретению. Термин включает предупреждение распространения инфекции у субъекта, который подвергся воздействию вируса или подверженному риску возникновения инфекции вирусом гриппа.

Как используется в данном документе, "защитный эффект" может быть продемонстрирован с помощью любой стандартной процедуры, известной из уровня техники для определения того, может ли средство, такой как противовирусное средство, или антитело, такое как антитело к HA вируса гриппа по настоящему изобретению, продемонстрировать одно или более из следующего: например, повышение выживаемости после воздействия инфекционного средства, снижение вирусной нагрузки или уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекционным агентом.

Используемый в данном документе термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому антибактериальному лекарственному средству или терапевтическому препарату, применяемым для лечения, предупреждения или уменьшения тяжести вирусной инфекции у субъекта. Термин "противовирусное лекарственное средство" включает без ограничения TAMIFLU® (озельтамивир), RELENZA® (занамивир), рибавирин или интерферон-альфа2b. В настоящем изобретении подлежащая лечению инфекция вызывается вирусом гриппа.

Общее описание.

Грипп представляет собой инфекционное заболевание, вызванное РНК-вирусами семейства Orthomyxoviridae (вирусы гриппа). Вирусы гриппа классифицируют на основе корового белка на три разновидности - А, В и С, которые дополнительно подразделяются на подтипы, определенные вирусными оболочечными гликопротеинами гемагглютинином (HA) и нейраминидазой (NA). Вирус гриппа А инфицирует ряд видов млекопитающих и птиц, тогда как инфекции В и С в значительной степени ограничены людьми. Заболевание у человека вызывают только типы А и В.

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

Ответ нейтрализующего антитела на вирус гриппа А, как правило, является специфичным в отношении данного вирусного подтипа. Существует 18 подтипов вируса гриппа А, определяемых их белками гемагглютинина ("HA"). 18 HA, H1-H18, можно разделить на две группы. Группа 1 состоит из подтипов H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 и H18, и группа 2 включает подтипы H3, H4, H7, H10, H14 и H15. По этим причинам было бы весьма желательно иметь вакцину, которая широко индуцирует нейтрализующие антитела, способные нейтрализовать все подтипы вируса гриппа А, а также их ежегодные варианты. Кроме того, широко нейтрализующие гетеросубтипические антитела можно было бы вводить в качестве лекарственных препаратов для предупреждения или терапии инфекции вирусом гриппа А.

HA синтезируется в виде гомо-тримерного предшественника HA0. Каждый мономер можно независимо расщеплять посттрансляционно с образованием двух полипептидов HA1 и HA2, связанных единственной дисульфидной связью. Более крупный N-концевой фрагмент (аминокислоты HA1 320-330) образует мембранно-дистальный глобулярный домен, который содержит рецептор-связывающий сайт и большинство детерминант, распознаваемых вирус-нейтрализующими антителами. Полипептид HA1 HA отвечает за прикрепление вируса к клеточной поверхности. Меньшая C-концевая часть (HA2, приблизительно 180 аминокислот) образует стержнеобразную структуру, которая прикрепляет глобулярный домен к клеточной или вирусной мембране. Полипептид HA2 опосредует слияние вирусных и клеточных мембран в эндосомах, обеспечивая высвобождение комплекса рибонуклеиновой кислоты в цитоплазму.

Ограниченный успех был только в идентификации антител, которые нейтрализуют более чем один подтип вируса гриппа А. Дополнительно, необходимость в нейтрализации антител, идентифицированных к настоящему времени, является узкой и их активность является низкой. Okuno et al. иммунизировали мышей вирусом гриппа A/Okuda/57 (H2N2) и выделили антитело моноклональное антитело (C179), которое связывается с консервативным конформационным эпитопом в HA2 и нейтрализует вирусы

гриппа А подтипов H2, H1 и H5 группы 1 *in vitro* и *in vivo* в животных моделях ((Okuno et al., J. Virol. 67:2552-8, 1993).

Несмотря на десятилетие исследований, отсутствуют доступные на рынке антитела, которые в значительной степени нейтрализуют или подавляют инфекцию вируса гриппа А или ослабляют заболевание, вызываемое вирусом гриппа А. Таким образом, существует необходимость в идентификации новых антител, которые нейтрализуют несколько подтипов вируса гриппа А, и их можно применять в качестве лекарственных препаратов для предупреждения или терапии инфекции вирусом гриппа А.

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

Авторы настоящего изобретения описали в данном документе полностью человеческие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с гемагглютинином вируса гриппа А и модулируют взаимодействие вируса гриппа А с клетками-хозяевами. Антитела к HA группы 2 вируса гриппа А могут связываться с HA вируса гриппа с высокой аффинностью. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению блокируют антитела, где антитела могут связываться с HA вируса гриппа А и блокировать прикрепление вируса к клетке-хозяину и/или его проникновение в нее. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела по настоящему изобретению могут блокировать связывание вируса гриппа А с клетками и, как таковые, могут подавлять или нейтрализовать вирусную инвазию клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела могут быть применимы для лечения субъекта, страдающего от инфекции вирусом гриппа А. При введении нуждающемуся в этом субъекту антитела могут уменьшать у субъекта инфицирование вирусом, таким как грипп. Их можно использовать для уменьшения вирусных нагрузок у субъекта. Их можно применять отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими молекулами или способами воздействия, известными из уровня техники, для лечения вирусной инфекции. В определенных вариантах осуществления эти антитела могут связываться с эпитопом в участке стебля вирусного HA. Кроме того, идентифицированные антитела можно применять профилактически (до инфицирования) для защиты млекопитающего от инфекции или можно применять терапевтически (после развития инфекции) для облегчения ранее развившейся инфекции или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией.

Полноразмерные аминокислотные последовательности двух иллюстративных HA группы 2 вируса гриппа А показаны в GenBank под номером доступа ACF41911.1 (из A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2), см. также SEQ ID NO: 33) и номером доступа AAR02640.1 (из A/chicken/Netherlands/01/2003 (H7N7)) (см. также SEQ ID NO:34).

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получены от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный HA вируса гриппа А, или рекомбинантной формой HA вируса гриппа А или их фрагментами с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенетически активным фрагментом HA вируса гриппа А. В определенных вариантах осуществления антитела получены от мышей, иммунизированных композицией на основе вакцины против вируса гриппа А с последующей бустерной иммунизацией одним или более рекомбинантно полученными пептидами HA.

В определенных вариантах осуществления мышей иммунизировали с использованием A/Hong Kong/08/1968 (H3N2), затем A/Hong Kong/05/1972-PR8-X36 (H3N2), а затем с использованием A/Hong Kong/08/1968 (H3N2). Всем мышам проводили бустерную иммунизацию смесью ДНК 1:1, кодирующей HA из A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2) и A/chicken/Netherlands/01/2003 (H7N7).

Имуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент HA или ДНК вируса гриппа А, кодирующий его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из участка стебля белка HA. (См. Sui et al., Nature Struct. and Mol. Biol., опубликованный online 22 февраля 2009 г.; страницы 1-9).

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

Определенные антитела к HA группы 2 вируса гриппа А способны связываться с ним и нейтрализовать активность HA вируса гриппа А, как определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по настоящему изобретению связываться с HA группы 2 вируса гриппа А и нейтрализовывать его активность, и тем самым прикрепление и/или проникновение вируса в клетку-хозяина с последующей вирусной инфекцией, может быть измерена с применением любого стандартного способа, известного специалистам в данной области, включая анализы связывания или анализы активности, как описано в данном документе.

Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примере 3 данного документа. В примере 3 определяли аффинность связывания и константы диссоциации НА группы 2 вируса гриппа А для НА группы 2 вируса гриппа А с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore. В примере 4 анализы нейтрализации использовали для определения инфицирующей способности различных штаммов группы 2 вируса гриппа. Было показано, что в примере 5 определенные антитела опосредуют комплементзависимую цитотоксичность (CDC), или в примере 6 определенные антитела опосредуют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) инфицированных вирусом клеток *in vitro*. Пример 7 демонстрирует, что некоторые антитела по настоящему изобретению способны нейтрализовать инфекцию вирусом гриппа А *in vivo*.

Антитела, специфичные к НА группы 2 вируса гриппа А, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности. В одном варианте осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или МРТ-выявляемую метку. В определенных вариантах осуществления такие меченые антитела можно использовать в диагностических исследованиях, в том числе в диагностических исследованиях с визуализацией.

Антигенсвязывающие фрагменты антител.

Если конкретно не указано иное, то термин "антитело", используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий молекулы антител, которые содержат две тяжелые цепи иммуноглобулинов и две легкие цепи иммуноглобулинов (т.е. "полные молекулы антител"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемые в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с НА группы 2 вируса гриппа А. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В определенных вариантах осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту полипептида или его полиспецифической антигенсвязывающей молекуле. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с помощью любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающие манипулирование с ДНК, кодирующей вариабельные и (необязательно) константные домены антитела, и осуществление ее экспрессии. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, включения остатков пептида, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетра-тела, минитела, нанотела (например, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т. д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка небольшого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностям или прилегает к ней. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельный участок может быть димерным и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L-домен.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1 , (ii) V_H-C_H2 , (iii) V_H-C_H3 , (iv) $V_H-C_H1-C_H2$, (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$, (vi) $V_H-C_H2-C_H3$, (vii) V_H-C_L , (viii) V_L-C_H1 , (ix) V_L-C_H2 , (x) V_L-C_H3 , (xi) $V_L-C_H1-C_H2$, (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$, (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любых иллюстративных конфигурациях, изложенных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью целого шарнирного или линкерного участка или его части. Шарнирный участок может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций переменных и константных доменов, изложенных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(-ых) связи(-ей)).

Как и в случае с полными молекулами антител антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же антигена. Любой формат полиспецифических антител, в том числе форматы иллюстративных биспецифических антител, раскрытых в данном документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных методик, доступных из уровня техники.

Получение человеческих антител.

Способы создания человеческих антител у трансгенных мышей известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с НА группы 2 вируса гриппа А. Иммуноген, содержащий любое из нижеследующих, можно применять для получения антител к НА группы 2 вируса гриппа А. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получены от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным НА группы 2 вируса гриппа А (см., например, номера доступа в GenBank ACF41911.1 или AAR02640.1), или живым аттенуированным или инактивированным вирусом, или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. В качестве альтернативы НА группы 2 вируса гриппа А или его фрагмент можно получать с применением стандартных биохимических технологий, а также модифицировать и применять в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантно полученный белок НА группы 2 вируса гриппа А или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноген может представлять собой вакцину против вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления можно вводить одну или более бустерных инъекций. В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать один или более вирусов гриппа или гемагглютининов, полученных из этих штаммов, например, A/Hong Kong/08/1968 (H3N2) с последующим A/Hong Kong/05/1972-PR8-X36 (H3N2), а затем с A/Hong Kong/08/1968 (H3N2). Всем мышам проводили бустерную иммунизацию смесью ДНК 1:1, кодирующей НА из A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2) и A/chicken/Netherlands/01/2003 (H7N7). В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать смесь 1:1 штаммов вируса гриппа или смесь 1:1 гемагглютининов, полученных из штаммов или ДНК, кодирующей НА. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид НА вируса гриппа, экспрессируемый в *E. coli* или в других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO) или его вирус гриппа.

С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа создания моноклональных антител первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, имеющие человеческий переменный участок и мышинный константный участок. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие переменные участки тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных участков, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческий переменный участок и мышинный константный участок. ДНК, кодирующую переменные участки тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные участки тяжелой и легкой цепей. Затем обеспечивают экспрессию ДНК в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, в мышь VELOCIMMUNE® вводят представляющий интерес антиген, и из мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические

клетки можно подвергнуть слиянию с линией миеломных клеток с получением иммортализованных линий клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую вариabельные участки тяжелой цепи и легкой цепей, можно выделять и связывать с константными участками требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепей. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. В качестве альтернативы ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или вариabельные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческий вариabельный участок и мышинный константный участок. Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Мышинные константные участки заменяют на требуемые человеческие константные участки с получением полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, дикого типа или модифицированные IgG1 или IgG4. Хотя отобранный константный участок может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики, заключающиеся в высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи вариabельному участку.

Биологические эквиваленты.

Антитела к НА группы 2 вируса гриппа А и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, однако которые сохраняют способность связывать НА вируса гриппа А. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, однако проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело по настоящему изобретению, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по сути являются биологическими эквивалентами антитела или фрагмента антитела по настоящему изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень поглощения которых значительно не отличаются при введении одинаковой молярной дозы в сходных экспериментальных условиях в случае либо однократной дозы, либо множества доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны в степени их поглощения, но не в скорости их поглощения, и все еще могут считаться биологически эквивалентными, поскольку такие различия в скорости поглощения предусмотрены и отражены при введении метки, не являются существенными для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, например, при длительном применении, и считаются несущественными с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или активности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если один или более раз может быть осуществлен переход с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшенной эффективности, по сравнению с длительной терапией без такого перехода.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия по отношению к условию или условиям применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

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

Биологические эквиваленты антител по настоящему изобретению можно конструировать с помощью, например, создания различных замен остатков или последовательностей или делегирования концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остаток цистеина, не являющиеся значимыми для биологической ак-

тивности, можно подвергнуть делеции или заменить на другие аминокислоты для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые обеспечивают устранение или удаление гликозилирования.

Антитела к НА вируса гриппа. Антитела, содержащие Fc-варианты.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрена антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, содержащие Fc-домен, который содержит одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к НА вируса гриппа, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-участке Fc-домена, где мутация(-и) обеспечивает(-ют) повышение аффинности Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьируется от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S), модификацию 428L, 2591 (например, V259I) и 308F (например, V308F), модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y), модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E), модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, содержащие Fc-домен, который содержит одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L), 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E), 428L и 434S (например, M428L и N434S), 257I и 311I (например, P257I и Q311I), 257I и 434H (например, P257I и N434H), 376V и 434H (например, D376V и N434H), 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A), а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-доме и другие мутации в пределах вариабельных доменов антител, раскрытых в данном документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, содержащие химерный константный участок тяжелой цепи (C_H), где химерный участок C_H содержит сегменты, полученные из участков C_H более чем одного источника иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерный участок C_H, содержащий часть домена C_H2 или весь этот домен, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью домена C_H3 или всем этим доменом, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерный участок C_H, имеющий химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки положений 216-227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирного участка IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки положений 228-236 согласно нумерации EUt), полученной из шарнирного участка IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерный шарнирный участок содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной последовательности IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной последовательности IgG2 человека. Антитело, содержащее химерный участок C_H, описанный в данном документе, может, в определенных вариантах осуществления, проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на патент США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Биологические характеристики антител.

В целом, антитела по настоящему изобретению функционируют за счет связывания с НА группы 2 вируса гриппа А. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с НА группы 2 вируса гриппа А (например, при 25°C или при 37°C) с K_D, составляющей менее 10 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore, или с помощью биодатчика на основе биослойной интерферометрии в реальном времени (анализ Octet HTX). В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают НА группы 2 вируса гриппа А с K_D, составляющей менее приблизительно 5 нМ,

менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 500 пМ, менее 250 пМ или менее 100 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

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

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые нейтрализуют инфицирующую способность вируса гриппа в отношении его клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления антитела проявляют активность нейтрализации против различных типичных штаммов группы 2 вирусов гриппа A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2); A/Philippines/01/1982 (H3N2) и A/Shanghai/01/2013-PR8 (H7N9) с IC_{50} в диапазоне от приблизительно 5,7 нМ до приблизительно 405 нМ в анализе микронейтрализации, например, как показано в примере 4, или по сути аналогичном анализе.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые опосредуют комплементзависимую цитотоксичность инфицированных клеток, характеризующуюся показателем EC_{50} 140 нМ с максимальным лизисом 78,3% (см. пример 5). В одном варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты опосредуют антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) инфицированных клеток, как показано с помощью репортерного анализа, и способность лизировать клетки, имеющие НА, с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС). В репортерном анализе EC_{50} составляло 0,8714 нМ для H1N14611N2 и 0,6882 нМ для H1N14612N2. В анализе типа РВМС EC_{50} составляло 0,1463 нМ для H1N14611N2 и 0,1762 нМ для H1N14612N2. (См. пример 6).

Настоящее изобретение также включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, которые демонстрируют усиление защитной функции или сильную нейтрализацию инфекции вирусом гриппа А *in vivo*. Определенные антитела проявляют сильную нейтрализацию при введении с терапевтической целью (после инфицирования; см. пример 7). В одном варианте осуществления одна доза H1N14611N2 при 7 мг/кг или 15 мг/кг, вводимая через 96 часов после инфицирования, приводила в результате к получению 80% и 100% выживаемости у мышей (соответственно) при введении с терапевтической целью. Также наблюдали один процент выживаемости, когда определенные иллюстративные антитела (H1N14611N2 и H1N14612N2) вводили в виде однократной дозы, составляющей 15 мг/кг, через 24, 48 или 72 часа после инфицирования. В одном варианте осуществления H1N14611N2 продемонстрировало дополнительный защитный эффект у инфицированных вирусом гриппа млекопитающих при объединении с противовирусным лекарственным средством озельтамивиром.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с НА группы 2 вируса гриппа А, где антитело имеет две или более из следующих характеристик: (а) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связывается с НА группы 2 вируса гриппа А с константой диссоциации (K_D), составляющей менее 10^{-8} М, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса; (с) демонстрирует диссоциативный период полужизни ($t^{1/2}$), составляющий более 75 минут; (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов группы 2 гриппа А, выбранных из штаммов H3N2 и H7N9 характеризующуюся показателем IC_{50} , составляющим менее приблизительно 200 нМ и 500 нМ, соответственно; (е) демонстрирует комплемент-опосредованный лизис инфицированных вирусом гриппа клеток, характеризующийся показателем EC_{50} , составляющим менее приблизительно 150 нМ; (f) демонстрирует антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность в отношении вируса целевых клеток, инфицированных вирусом, при использовании репортерного биоанализа, характеризующуюся показателем EC_{50} , составляющим менее приблизительно 0,9 нМ; (g) демонстрирует антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность в отношении целевых клеток, инфицированных вирусом, в присутствии человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), характеризующуюся показателем EC_{50} , составляющим менее приблизительно 0,180 нМ; (h) демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, при введении через 24, 48, 72 или 96 часов после заражения вирусом; (i) демонстрирует увеличение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, при введении в комбинации с озельтамивиром через 96 часов после инфицирования; или (j) где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющих

комплементарность участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащихся в любой из последовательностей вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в табл. 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в любой из последовательностей вариабельного участка тяжелой цепи (LCVR), перечисленных в табл. 1.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать двумя или более из вышеуказанных биологических характеристик или любых их комбинаций. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области из обзора настоящего изобретения, включая практические примеры из данного документа.

Картирование эпитопов и связанные с ним методики.

Настоящее изобретение включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в одном или более доменах молекулы НА группы 2 вируса гриппа А. Эпитоп, с которым антитела связываются, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот, расположенных в пределах молекулы НА вируса гриппа (например, линейного эпитопа в домене). В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в молекуле НА группы 2 вируса гриппа А (например, конформационный эпитоп).

Разные методики, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для определения наличия "взаимодействия с одной или более аминокислотами" антитела в пределах полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, стандартный эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие, как описаны в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают аланин-сканирующий мутагенез, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования с расщеплением пептидов и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстрагирование эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый при помощи масс-спектрометрии. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченным дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному дейтерий-водородному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности взаимодействия. Как результат, аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, проявлять относительно более высокие массы по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, за счет чего выявляют остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) *Analytical Chemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73. 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым вступают в реакцию В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут образовываться из как непрерывных аминокислот, так и не являющихся непрерывными аминокислот, сближенных за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные непрерывными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные за счет укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

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

В определенных вариантах осуществления антитела к НА группы 2 вируса гриппа А или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах любого или более участков, представленных в НА вируса гриппа, либо в природной форме, либо форме, полученной рекомбинант-

ным путем, либо с его фрагментом.

Настоящее изобретение также включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, которые связываются с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа. Аналогичным образом настоящее изобретение также включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, которые конкурируют за связывание с НА группы 2 вируса гриппа А или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе. Например, настоящее изобретение включает антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, которые перекрестно конкурируют за связывание с НА группы 2 вируса гриппа А с одним или более антителами, полученными из антител, описанных в табл. 1.

Используя стандартные способы, известные в данной области техники, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и референтное антитело к НА группы 2 вируса гриппа А или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же самым эпитопом, что и референтное антитело к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению, обеспечивают возможность связывания референтного антитела с НА группы 2 вируса гриппа А или пептидом при насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой НА группы 2 вируса гриппа А. Если тестируемое антитело способно связываться с НА группы 2 вируса гриппа А после насыщающего связывания с референтным антителом к НА группы 2 вируса гриппа А, можно сделать заключение, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается референтное антитело к НА группы 2 вируса гриппа А. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с НА группы 2 вируса гриппа А после насыщающего связывания с референтным антителом к НА группы 2 вируса гриппа А, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом что и эпитоп, который связан эталонным антителом к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению.

Для определения того, имеет ли место конкуренция за связывание с референтным антителом к НА группы 2 вируса гриппа А, описанную выше методику исследования связывания осуществляют в двух направлениях: в первом направлении обеспечивают возможность связывания референтного антитела с НА группы 2 вируса гриппа А при насыщающих условиях с последующим оцениванием связывания тестируемого антитела с молекулой НА группы 2 вируса гриппа А. Во втором направлении обеспечивают возможность связывания тестируемого антитела с НА группы 2 вируса гриппа А при насыщающих условиях с последующим оцениванием связывания референтного антитела с молекулой НА группы 2 вируса гриппа А. Если в обоих направлениях только первое (насыщающие условия) антитело способно к связыванию с молекулой НА группы 2 вируса гриппа А, то делают заключение, что тестируемое антитело и референтное антитело конкурируют за связывание с НА группы 2 вируса гриппа А. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с референтным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, как и референтное антитело, но может пространственно блокировать связывание референтного антитела за счет связывания перекрывающего или смежного эпитопа.

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

Дополнительные стандартные эксперименты (например, мутации в пептидах и анализы связывания) можно в дальнейшем провести для того, чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено фактом связывания с одним и тем же эпитопом, с которым связывается и референтное антитело, или что пространственное блокирование (или другое явление) является ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно проводить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, существующего в данной области техники.

Иммуноконъюгаты.

Настоящее антитело охватывает человеческое моноклональное антитело к НА группы 2 вируса гриппа А, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгатом"), таким как анатоксин или противовирусное лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. Используемый в данном документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым фрагментом или фрагментом-репортером, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средством. Данное антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым фрагментом или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средст-

вом в любом месте по все длине молекулы, которая является настолько длинной, что она способна связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитела и лекарственного средства и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления данное средство может представлять собой второе отличающееся антитело к НА вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления данное антитело может быть конъюгировано со средством, которое является специфичным по отношению к клеткам, инфицированным вирусом. При выборе типа терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к НА вируса гриппа, примут во внимание подлежащее лечению состояние и требующий достижения терапевтический эффект. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими.

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

Любые из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или их вариантов можно сконструировать с использованием стандартных молекулярно-биологических методик (например, методики рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к НА группы 2 вируса гриппа А, получают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные участки, связывающиеся с отличающимися доменами НА группы 2 вируса гриппа А, соединены вместе для придания двухдоменной специфичности одной связывающей молекуле. Соответственно, полученные свойства биспецифичности могут усиливать общую ингибиторную эффективность по отношению к НА группы 2 вируса гриппа А посредством как повышения специфичности, так и avidности связывания. Переменные участки, специфичные к отдельным доменам (например, сегменты N-концевого домена), или те, которые могут связываться с разными участками в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждому участку одновременно связываться с отдельными эпитопами, или с разными участками в пределах одного домена. В одном примере для создания биспецифичности переменные участки тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы со специфичностью к одному домену подвергают рекомбинации с переменными участками легкой цепи (V_L) из ряда связывающих молекул со специфичностью ко второму домену для идентификации некогнатных партнеров V_L , которые можно объединять в пару с исходным V_H без нарушения первоначальной специфичности V_H . Таким же способом можно объединять отдельный сегмент V_L (например, V_{L1}) с двумя разными V_H -доменами (например, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих "плечей" ($V_{H1} - V_{L1}$ и $V_{H2} - V_{L1}$). Использование отдельного сегмента V_L уменьшает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность способов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно антитела, которые связывают несколько доменов и вторую мишень, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к НА группы 2 вируса гриппа А, можно получать в биспецифическом формате с использованием описанных в данном документе методик или других методик, известных специалисту в данной области техники. Переменные участки антитела, связывающиеся с отличающимися участками, можно соединять вместе с переменными участками, который связываются с соответствующими сайтами на, например, вирусе гриппа для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Переменные участки со специфичностью к внеклеточному домену объединяют с переменным участком со специфичностью к наружной части внеклеточного домена и объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждому переменному участку связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративное антитело в биспецифическом формате, которое можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение C_{H3} -домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_{H3} -домена второго иммуноглобулина Ig, где C_{H3} -домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где отличие в по меньшей мере одну аминокислоту ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует отличие по аминокислотам. В одном варианте осуществления первый C_{H3} -домен Ig связывает белок А, а второй C_{H3} -домен Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT; H435R нумерация согласно EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C_{H3} : D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N,

V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

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

Терапевтическое введение и составы.

В настоящем изобретении представлены терапевтические композиции, содержащие антитела к НА группы 2 вируса гриппа А или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и им подобных. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, хорошо известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие (катионные или анионные) липиды пузырьки (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т. п. При использовании антитела по настоящему изобретению для лечения у взрослого пациента заболевания или нарушения или для предупреждения заболевания преимущественным является введение антитела по настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 60 мг/кг веса тела, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 60, от приблизительно 10 до приблизительно 50 или от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и длительность лечения. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в качестве начальной дозы, составляющей от по меньшей мере приблизительно 0,1 мг до приблизительно 5000 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 10 до приблизительно 500 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В определенных вариантах осуществления после начальной дозы может следовать введение вторичной дозы или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же самым или меньше начальной дозы, где повторные введения доз разделены промежутком от по меньшей мере 1 дня до 3 дней; в по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

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

Применение наночастиц для доставки антитела по настоящему изобретению также предусмотрено в данном документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать для применений как в терапии, так и в диагностике. Наночастицы, конъюгированные с антителом, и способы их получе-

ния и применения подробно описаны в Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенная в данный документ посредством ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целенаправленного воздействия на инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны в патентных документах, например, US 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен в данный документ во всей своей полноте.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать помпу. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени для композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы.

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

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению свободно можно использовать устройство для доставки по типу шприца-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручки обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и поместить новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприц-ручки затем можно повторно использовать. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприц-ручки сменный картридж отсутствует. Вернее, одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручки предварительно заполнено фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения из резервуара фармацевтической композиции выбрасывают все устройство.

При подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению используют разнообразные шприцы-ручки многоразового применения и автоинъекторные устройства для доставки. Примеры включают, но, разумеется, без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь несколько из них. Примеры устройств для доставки в виде шприца-ручки многоразового применения, используемых при подкожном введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но, разумеется, без ограничения шприц-ручку SOLOSTA щц R щ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EP-IPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс), при этом упомянуты лишь несколько из них.

Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в лекарственных формах в стандартной дозе, приспособленной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 5000 мг в стандартной дозе лекарственной формы; предпочтительно, чтобы содержание антитела в других лекарственных форм составляло от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг и от приблизительно

10 до приблизительно 250 мг.

Виды применения антител в терапии.

Антитела по настоящему изобретению являются применимыми для лечения и/или предупреждения заболевания, или нарушения, или состояния, ассоциированного с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, и/или для уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием.

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

Одно или более антител по настоящему изобретению можно вводить для ослабления, или предупреждения, или снижения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или нарушения. Антитела можно применять для облегчения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной вирусом гриппа, включая без ограничения лихорадку, кашель, боль в горле, головную боль, боль в теле, утомляемость, сильное истощение, одышку, бронхит, пневмонии и смерть.

Также в данном документе предусмотрено применение с профилактической целью одного или более антител по настоящему изобретению у субъектов с риском развития инфекции, вызываемой вирусом гриппа, у таких как иммунокомпрометированные индивидуумы, пожилые люди (в возрасте старше 65 лет), дети возрастом младше 2 лет, работники сферы здравоохранения, члены семьи, находящиеся рядом с пациентом, страдающим инфекцией, вызванной вирусом гриппа, и пациенты с сопутствующим нарушением в анамнезе (например, с повышенным риском легочной инфекции, сердечно-сосудистого заболевания или диабета).

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции, вызванной вирусом гриппа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют в качестве вспомогательной терапии с каким-либо другим средством или любой другой терапией, известной специалистам в данной области техники, применимой для лечения или уменьшения тяжести инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Виды комбинированной терапии.

Виды комбинированной терапии могут включать антитело к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению и какое-либо дополнительное терапевтическое средство, которое можно преимущественно объединять с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно синергически объединять с одним или более лекарственными средствами или средствами (например, противовирусными средствами), применяемыми для лечения гриппа.

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

Другие иллюстративные противовирусные лекарственные средства включают без ограничения ингибитор НА, ингибитор сиаловой кислоты и ингибитор ионного канала M2. В одном варианте осуществления ингибитором ионного канала M2 является амантадин или римантадин.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно объединять со вторым терапевтическим средством для снижения вирусной нагрузки у пациента с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, или для уменьшения тяжести одного или более симптомов инфекции.

Антитела по настоящему изобретению можно применять в комбинации с противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), деконгестантом, антигистаминным лекарственным средством, противомикробным лекарственным средством, другим антителом к вирусу гриппа, противовирусным лекарственным средством, вакциной против гриппа, такой как FLUMIST® или FLUVIRIN®, пищевой добавкой, такой как антиоксиданты, или любым другим средством паллиативной терапии для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к вирусу гриппа. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к гемагглютинуину гриппа. В определенных вариантах

осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к другому белку вируса гриппа, такому как нейраминидаза или тетрамерный эктодомен матричного белка 2 (белок М2е). В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой антитело к другому белку, такому как трансмембранная сериновая протеаза 2 (TMPRSS2). Второе антитело может быть специфичным в отношении одного или более различных белков вируса гриппа из различных подтипов или штаммов вируса. В данном документе представлено применение комбинации ("коктейля") антител с широким спектром нейтрализующей или ингибирующей активностью по отношению к вирусу гриппа. В некоторых вариантах осуществления не конкурирующие антитела можно объединять и вводить нуждающемуся в этом субъекту для снижения способности вируса гриппа ускользать посредством быстрой мутации как результата селективного давления. В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие комбинацию, связываются с различными неперекрывающимися эпитопами на белке НА. Антитела, содержащие комбинацию, могут блокировать присоединение вируса, и/или вхождение в клетки-хозяева, и/или слияние с клетками-хозяевами. Антитела могут взаимодействовать с гемагглютинином, выбранным из любого одного или более подтипов гриппа А группы 2, включая подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15, и при их использовании по отдельности или в комбинации с любым одним или более из средств, указанных выше, могут нейтрализовать любой один или более подтипов вируса гриппа группы 2, включая без ограничения следующие: Н3Н2, Н7Н9.

Также в данном документе предусмотрено применение комбинации антител к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению, где комбинация содержит одно или более антител, которые перекрестно не конкурируют; в некоторых вариантах осуществления комбинация включает первое антитело с широким спектром нейтрализующей активности со вторым антителом с активностью в отношении узкого спектра изолятов и которое не конкурирует с первым антителом.

Используемое в данном документе выражение "в комбинации с" означает, что дополнительный(-е) терапевтически активный(-е) компонент(-ы) можно вводить до введения, одновременно с ним или после введения антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению. Выражение "в комбинации с" также включает последовательное или совместное введение антитела к НА вируса гриппа и второго терапевтического средства.

Дополнительный терапевтически активный(-е) компонент(-ы) можно вводить субъекту до введения антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 часа до, за 60 часов до, за 48 часов до, за 36 часов до, за 24 часа до, за 12 часов до, за 6 часов до, за 5 часов до, за 4 часа до, за 3 часа до, за 2 часа до, за 1 час до, за 30 минут до, за 15 минут до, за 10 минут до, за 5 минут до или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент (компоненты) можно вводить субъекту после введения антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, через 5 минут после, через 10 минут после, через 15 минут после, через 30 минут после, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа после, через 4 часа после, через 5 часов после, через 6 часов после, через 12 часов после, через 24 часа после, через 36 часов после, через 48 часов после, через 60 часов после или через 72 часа после введения второго компонента. В еще одних вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент (компоненты) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение субъекту антитела к НА вируса гриппа А группы 2 и дополнительного терапевтически активного компонента в единичной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 минут или менее относительно друг друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму вводят посредством одного и того же пути (например, оба антитела к НА группы 2 вируса гриппа А и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно каждую лекарственную форму можно вводить разными путями (например, антитело к НА группы 2 вируса гриппа А можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). Так или иначе, но все введения компонентов в единичной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах или в отдельных лекарственных формах разными путями считаются "одновременным введением" для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего раскрытия введение антитела к НА группы 2 вируса гриппа А "до", "одновременно с введением" или "после" (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением антитела к НА группы 2 вируса гриппа А "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению составлено совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными(-и) компонентом(-ами), описанными в данном документе в других частях.

Схемы введения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления однократную дозу антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к НА группы 2 вируса гриппа А и какие-либо дополнительные терапевтически активные средства, упомянутые в данном документе) можно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению несколько доз антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к НА группы 2 вируса гриппа А и какие-либо дополнительные терапевтически активные средства, упомянутые в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с данным аспектом по настоящему изобретению предусматривают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению. Используемое в данном документе выражение "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к НА группы 2 вируса гриппа А вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные предварительным определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, затем одной или нескольких вторичных доз антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, а затем необязательно одной или нескольких третичных доз антитела к НА группы 2 вируса гриппа А.

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

В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят в течение от 1 до 48 часов (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или больше) после непосредственной предыдущей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает в последовательности из нескольких введений дозу антитела к НА группы 2 вируса гриппа А, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

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

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьироваться в ходе схемы лечения. Частоту введения может корректировать врач в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Виды применения антител в диагностике.

Антитела к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению можно использовать для выявления и/или измерения НА группы 2 вируса гриппа А в образце, например, для диагностических целей. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено использование одного или более антител по настоящему изобретению в анализах для выявления заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы для НА группы 2 вируса гриппа А могут предусматривать, например, приведение полученного от пациента образца в контакт с антителом к НА группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению, где антитело к НА группы 2 вируса гриппа А мечено детектируемой меткой или молекулой-репортером или используется в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения НА группы 2 вируса гриппа А из образцов от пациента. Альтернативно немеченое антитело к НА группы 2 вируса гриппа А можно использовать в диагностике в комбинации со

вторичным антителом, которое само по себе является меченным детектируемой меткой. Детектируемая метка или молекула-репортер может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для детектирования или измерения НА вируса гриппа А группы 2 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS).

Образцы, которые можно использовать в анализах диагностики НА вируса гриппа А группы 2 в соответствии с настоящим изобретением, включают образец любой ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит детектируемые количества либо НА вируса гриппа А группы 2, либо его фрагменты в нормальном или патологическом состояниях. Как правило, уровни НА вируса гриппа А группы 2 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания, ассоциированного с гриппом), можно измерять для начального определения исходного уровня или стандартного уровня НА вируса гриппа А группы 2. Затем этот исходный уровень НА группы 2 вируса гриппа А можно сравнивать с уровнями НА группы 2 вируса гриппа А, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на или имеющих ассоциированное с НА группы 2 вируса гриппа А состояние или симптомы, ассоциированные с таким состоянием.

Антитела, специфичные к НА группы 2 вируса гриппа А, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности.

Примеры

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

Пример 1. Получение человеческих антител к геммагглютинину (НА) группы 2 вируса гриппа А.

Человеческие антитела к НА группы 2 вируса гриппа А получали с использованием мыши VE-LOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали с использованием A/Hong Kong/08/1968 (H3N2), затем A/Hong Kong/05/1972-PR8-X36 (H3N2), а затем с использованием A/Hong Kong/08/1968 (H3N2). Всем мышам проводили бустерную иммунизацию смесью ДНК 1:1, кодирующей НА из A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2) и A/chicken/Netherlands/01/2003 (H7N7). Гуморальный иммунный ответ контролировали с использованием иммунологического анализа, специфичного для НА группы 2 вируса гриппа А. После достижения требуемого иммунного ответа отбирали спленциты и сливали их с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования линий клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбору для идентификации клеточных линий, которые продуцируют антитела к НА группы 2 вируса гриппа А. С использованием данной методики и разных иммуногенов, описанных выше, получили несколько химерных антител (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и константные домены грызуна).

Также антитела к НА группы 2 вируса гриппа А выделяли непосредственно из антиген-позитивных мышечных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который, в частности, включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. С помощью данного способа получили несколько полностью человеческих антител, специфических к НА вируса гриппа (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами).

Два иллюстративных антитела, описанные в данном документе, обозначены как H1H14611N2 и H1H14612N2.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами данного примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

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

В табл. 1 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей CDR и переменных участков тяжелой и легкой цепи выбранных антител к HA группы 2 вируса гриппа А по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3
H1H14611N2	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H14612N2	18	20	22	24	26	28	30	32

Таблица 2

Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3
H1H14611N2	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H14612N2	17	19	21	23	25	27	29	31

В данном документе антитела обычно упоминаются в соответствии со следующей номенклатурой: после префикса Fc (например, "H1H", "H2M" и т.д.) следует числовой идентификатор (например, "14611", "14612" и т.д., как показано в табл. 1 или 2), а затем следует суффикс "P", "P2", "N", "N2" или "B". Таким образом, в соответствии с данной номенклатурой антитело можно назвать в данном документе как, например, "H1H14611N2", "H1H14612N2" и т.д. Префиксы H1H или H2M в названиях антител, используемые в данном документе, указывают на конкретный изотип Fc-участка антитела. Например, антитело "H1M" имеет Fc мышинового IgG1, а антитело "H2M" имеет Fc мышинового IgG2 (изотип а или b) (все переменные участки являются полностью человеческими, на что указывает первая буква 'H' в обозначении антитела). Специалист в данной области техники примет во внимание, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc иного изотипа (например, антитело с Fc мышинового IgG1 можно превращать в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (в том числе CDR) - которые показаны числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1 и 2, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по сути аналогичными независимо от природы Fc-домена.

Пример 3. Показатели аффинности связывания и кинетические константы для моноклональных антител к HA группы 2 вируса гриппа А.

Показатели аффинности связывания и кинетические константы для человеческих моноклональных антител к HA группы 2 вируса гриппа А определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием формата антигенной ловушки. Измерения проводили на приборе Biacore. В данном формате поверхность сенсорного датчика высокой плотности Biacore дериватизировали путем иммобилизации по аминокислотной группе с моноклональным мышинным антителом к Fc человека для захвата антител к HA группы 2 вируса гриппа А, экспрессируемых с константными Fc-участками человека. Ассоциацию всех белков HA с каждым из захваченных mAb контролировали с использованием стандартных способов. Белки с доменом foldon, используемые в данном эксперименте, получали от BEI Resources или Influenza Reagent Resource (IRR), как показано в табл. 3 ниже. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и полупериоды диссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали исходя из констант кинетической скорости:

$$K_D (M) = \frac{k_{off}}{k_{on}}, \text{ и } t^{1/2} (\text{мин.}) = \frac{\ln(2)}{60 \times k_{off}}.$$

Параметры кинетики связывания для белков HA с поверхностно связанными антителами к HA при 37°C изложены в табл. 3.

Показатели аффинности связывания и кинетические параметры для связывания H1N14611N2 с белками HA, имеющими домен foldon, при 37°C

	Группа 1												Группа 2			
	A/Brisbane/59/2007 (H1) BEI Resources (NR-28607)		A/California/04/2009 (H1) BEI Resources (NR-15749)		A/Puerto Rico/08/1934 (H1) BEI Resources (NR-19240)		A/Vietnam/1203/2004 (H5) IRR (FR-39)		A/Indonesia/05/2005 (H5) IRR (FR-59)		A/Turkey/Wisconsin/01/1966 (H9) BEI Resources (NR-43782)		A/Hiroshima/52/2005 (H3) IRR (FR-63)		A/Shanghai/01/2013 (H7) BEI Resources (NR-44365)	
	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}	K _D	t _{1/2}
mAb	моль/л	мин.	моль/л	мин.	моль/л	мин.	моль/л	мин.	моль/л	мин.	моль/л	мин.	моль/л	мин.	моль/л	мин.
H1N14611N2 (группа 2, специфичность)	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	8,22E-09	86	IC [§]	IC
Буфер	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

IC[§]: неуверительный результат NB: отсутствие связывания Результаты H1N14611N2 связывает HA H3 группы 2 с высокой аффинностью (таблица 3). Равновесная константа диссоциации (значение K_D) было в нижней части нМ диапазона для A/Hiroshima/52/2005 (H3N2; K_D = 8,22E⁻⁰⁹). H1N14611N2 не связывалось со штаммами группы 1.

Пример 4. H1N14611N2 и H1N14612N2 эффективно нейтрализуют широкий спектр вирусов гриппа А группы 2.

Иллюстративные моноклональные антитела (mAb) H1N14611N2 и H1N14612N2 выбрали для *in vitro* анализов микронейтрализации с использованием двух разных форматов для оценки спектра действия и активности антител.

Жизнеспособность клеток в анализе микронейтрализации.

Моноклональные антитела тестировали в анализе микронейтрализации для оценки спектра действия и активности. Вкратце клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) высевали при 6,0×10³ клеток/лунка в 96-луночном планшете. В лунки фонового контроля добавляли только разбавитель для вируса. Клетки инкубировали в течение 4-5 часов при 37°C с 5% CO₂. Моноклональные антитела разбавляли при 4-кратной конечной концентрации в разбавителе для вируса. Антитела разбавляли 1:3 в двух параллелях. Вирус оттаивали на льду и разбавляли до соответствующей предварительно определенной концентрации. Разбавленный вирус добавляли к разбавленным mAb. Смесь вирус-mAb сразу же добавляли к клеткам MDCK и инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 72 ч. Также включали лунки с вирусным контролем и контрольными неинфицированными клетками. В день 4 планшеты центрифугировали при 1200 об/мин, в течение 3 минут. Клетки лизировали с использованием 100 мкл субстрата CellTiter-Glo и высвобождение АТФ измеряли по люминесценции (Victor X3, PerkinElmer). Процент жизнеспособности определяли по сравнению с неинфицированным контролем. Показатели жизнеспособности анализировали с использованием нелинейной 4PL регрессии для определения IC₅₀ (GraphPad Prism).

Анализ микронейтрализации HA.

Вкратце клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) высевали и инкубировали в течение ночи с достижением конfluence 80-100% на следующий день. Моноклональные антитела разбавляли в среде для вирусной среды (VIM) до 50 мкг/мл и разбавляли 1:2 в трех или четырех параллелях. H5N1 A/Vietnam/1203/2004 или H1N1 A/California/07/2009 разбавляли в VIM и добавляли к разведенным антителам и инкубировали в течение 1 ч. Затем образцы переносили в MDCK и инкубировали в течение 48 ч. После инкубации 50 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет. В супернатант добавляли разбавленные эритроциты индейки или лошади и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 или 60 мин. Титр гемагглютинации регистрировали как обратную величину последнего разбавления, которое полностью ингибировало гемагглютинацию.

Результаты.

Результаты показали, что H1N14611N2 и H1N14612N2 нейтрализуют ряд разнообразных изолятов вируса гриппа А группы 2 в анализах микронейтрализации. IC₅₀ (нМ) для H1N14611N2 и H1N14612N2 в

отношении нейтрализации трех разных штаммов гриппа (A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2), A/Philippines/01/1982 (H3N2) и A/Shanghai/01/2013-PR8 (H7N9)) показаны в табл. 4, кривые зависимости доза-ответ для штаммов, включающих A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2), A/Philippines/02/1982 (H3N2) и A/Shanghai/01/2013 (H7N9), также показаны соответственно на фиг. 1А, В и С (H1N14611N2 показано треугольниками; H1N14612N2 показано перевернутыми треугольниками; неспецифическое hIgG1 показано ромбами). Результаты дополнительных исследований нейтрализации штамма вируса гриппа A/Victoria/316/2011 (H3N2) с использованием данных геммагглютинации показаны в табл. 5. Приведенное в табл. 5 значение является наименьшей концентрацией mAb (нМ), при которой не выявили геммагглютинацию RBC. Также в данные исследования включали отрицательный контроль hIgG1.

Таблица 4

Сводная информация по нейтрализующей активности mAb к HA группы 2 в отношении нескольких штаммов вируса гриппа (IC₅₀, нМ)

mAb	A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2)	A/Philippines/01/1982 (H3N2)	A/Shanghai/01/2013-PR8 (H7N9)
H1N14611N2	7,830	68,37	404,7
H1N14612N2	5,700	37,60	>6666
Нецелевой/отрицательный контроль hIgG1	>833	>3333	>6666

Приведены данные по одному из по меньшей мере трех исследований, демонстрирующие аналогичные результаты.

Таблица 5

Сводная информация по нейтрализующей активности mAb к HA группы 2 в отношении штамма вируса гриппа A/Victoria/316/2011 (H3N2)

mAb	Концентрация (нМ)
H1N14611N2	41,7
H1N14612N2	166,7

Пример 5. H1N14611N2 и H1N14612N2 опосредуют уничтожение клеток, инфицированных HA вируса группы 2, посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

Иллюстративные моноклональные антитела (mAb) H1N14611N2 и H1N14612N2 выбрали для *in vitro* анализов комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Вкратце клетки Мадин-Дарби почек собак (MDCK) инфицировали с использованием A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2) при множественности заражения (MOI), составляющей 3, за 30 часов до анализа. Клетки-мишени объединяли с указанными mAb при указанных концентрациях. Комплемент из сыворотки крови здорового человека (NHSC) готовили три раза при конечной концентрации (15%) в среде для анализа CDC. Процент цитотоксичности измеряли с помощью CytoTox-Glo (Promega). Для определения максимального и фонового значений лизиса использовали фоновые контроли с лизирующим детергентом и сывороткой крови. На фиг. 2 показаны H1N14611N2 (показаны треугольниками), H1N14612N2 (показаны перевернутыми треугольниками) вместе с неспецифическим hIgG1 (показано ромбами) в качестве контроля. Процент специфического лизиса рассчитывали как ((лизис, вызванный mAb+NHSC) - (лизис, вызванный только NHSC))/((максимальный лизис, вызванный детергентом)-(лизис, вызванный только NHSC)) × 100.

Результаты.

H1N14611N2 и H1N14612N2 проявили дозозависимое повышение способности специфически лизировать инфицированные вирусом клетки при тестировании в анализе CDC с помощью MDCK, инфицированных A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2), в присутствии сыворотки крови человека с сохраненными белками комплемента. Результаты одного репрезентативного анализа CDC из трех показаны на фиг. 2. В данном эксперименте также использовали неспецифический/отрицательный контроль hIgG1. H1N14611N2 и H1N14612N2 были эффективными при опосредовании цитолиза с максимальным лизисом, составляющим 78,3% и 86,3%, и показателями EC₅₀, составляющими соответственно 140 нМ и 126 нМ.

Пример 6. H1N14611N2 и H1N14612N2 эффективно уничтожают клетки, экспрессирующие HA группы 2, посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC).

Иллюстративные моноклональные антитела H1N14611N2 и H1N14612N2 выбрали для проверки их способности специфически лизировать клетки, поверхностно экспрессирующие HA, в двух анализах антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности.

А. Анализ активации FcγR3A.

Для тестирования способности антител H1N14611N2 и H1N14612N2 специфически лизировать клетки, экспрессирующие на поверхности HA, исходно использовали анализ активации FcγR3A с использованием репортерного биоанализа ADCC-Glo (Promega) с клетками 3T3, сверхэкспрессирующими

A/Wisconsin/67/200 (H3N2). Клетки-мишени объединяли с указанными mAb при указанных концентрациях. Целевые и эффекторские клетки затем объединяли при соотношении Е:Т, составляющем 5:1. На фиг. 3 показаны результаты данного анализа с использованием H1N14611N2 (показано треугольниками), H1N14612N2 (показано перевернутыми треугольниками) вместе с неспецифическим hlgG1 (показано ромбами) в качестве контроля.

В. Анализ ADCC с использованием донорских человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Два иллюстративных антитела к HA группы 2, H1N14611N2 и H1N14612N2, далее тестировали в анализе ADCC с использованием PBMC человека. PBMC выделяли из донорских человеческих лейкоцитных пленок и стимулировали с помощью IL-2 (5 нг/мл) в течение 10-12 ч. перед использованием. Целевые клетки 3Т3, сверхэкспрессирующие A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), объединяли с указанными mAb при указанных концентрациях. Целевые и эффекторские клетки затем объединяли при соотношении Е:Т, составляющем 30:1. Процент цитотоксичности измеряли с помощью CytoTox-Glo (Promega). На фиг. 4 показаны результаты данного анализа с использованием H1N14611N2 (показано кругами), H1N14612N2 (показано перевернутыми треугольниками) вместе с неспецифическим hlgG1 (показано ромбами) в качестве контроля.

Результаты.

H1N14611N2 и H1N14612N2 проявили дозозависимое повышение способности специфически лизировать клетки, экспрессирующие на поверхности HA, в обоих анализах ADCC.

H1N14611N2 и H1N14612N2 показали дозозависимое повышение активации FcγR III A в репортерном биоанализе ADCC-Glo (Promega) с клетками 3Т3, сверхэкспрессирующими A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (фиг. 3). Показатель EC₅₀ для H1N14611N2 составил 0,8714 нМ и для H1N14612N2 - 0,6882 нМ.

ADCC-активность подтверждали с использованием прямой PBMC-опосредованной цитотоксичности инфицированных и сверхэкспрессирующих клеток. Показаны результаты использования человеческих донорских PBMC в анализе H1N14611N2- и H1N14612N2-опосредованной ADCC в отношении клеток 3Т3, сверхэкспрессирующих A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (фиг. 4). Показатель EC₅₀ для H1N14611N2 составил 0,1463 нМ и для H1N14612N2 - 0,1762 нМ.

Во всех экспериментах с применением донорских PBMC использовали соотношение эффектора и мишени (Е:Т), составляющее 30:1, тогда как в репортерном биоанализе использовали Е:Т, составляющее 5:1.

Пример 7. Выбранные моноклональные антитела, специфичные в отношении гемагглютинина группы 2 вируса гриппа А, эффективны *in vivo* в лечении смертельной инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Существует значительная неудовлетворенная потребность в улучшенных стандартах лечения для лечения или предупреждения инфекций, вызванных вирусом гриппа, у людей. В настоящее время доступны лишь два класса лекарственных средств: адамантаны и ингибиторы нейраминидазы (NAI). Адамантаны (амантадин и римантадин) были ассоциированы с быстрым появлением штаммов с резистентностью к лекарственным средствам, поэтому их больше не рекомендуют для лечения гриппа. NAI, например озельтамивир (TAMIFLU®), представляют собой лекарственные средства первой линии, предназначенные для лечения и профилактики гриппа, однако их диапазон эффективности ограничен: было показано, что NAI сокращают продолжительность симптомов лихорадки и заболевания приблизительно на один день согласно терапевтическому плану, если противовирусное средство вводят в течение 48 часов после появления симптомов, но при этом они проявляют незначительную клинически подтвержденную эффективность при введении через 48 часов.

Для оценки *in vivo* эффективности H1N14611N2 и H1N14612N2 в лечение тяжелого гриппа эксперименты проводили с учетом следующих целей:

исследование 1: оценить эффективность однократной дозы H1N14611N2 и H1N14612N2.

Исследование 2: определить эффективность H1N14611N2 при введении в комбинации с озельтамивиром.

Штамм, используемый в данных исследованиях, представлял собой изолят вируса гриппа А группы 2 A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2), адаптированный для мышей. Все эксперименты проводили на самках мышей дикого типа (BALB/c) 6-недельного возраста. Мышей заражали с использованием 5 x MLD₅₀ (10000 БОЕ) A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2). В моделях с лечением мышей заражали интраназально (и/н) в день 0 и фиксированные дозы согласно инструкциям производителя и мышам вводили дозу каждые 12 ч. (т.е. два раза в день, BID) через желудочный зонд в течение 5 дней, при этом первую дозу вводили в день 4. Мышей взвешивали и осуществляли ежедневное наблюдение до дня 14 п.и., а затем их умерщвляли, когда они теряли 20% от их исходного веса. Результаты представлены в виде процента выживаемости.

В первом эксперименте сравнивали эффективность либо однократной дозы H1N14611N2 (15 мг/кг; показано треугольниками), либо H1N14612N2 (15 мг/кг; показано перевернутыми треугольниками), начиная с моментов времени 24, 48 или 72 часа после инфицирования с использованием 5 X MLD₅₀ A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2) для оценки эффекта на мышинной модели в данные моменты времени. Все мыши, получающие 15 мг/кг изотипического контроля в момент времени 24 часа после инфицирования,

погибли к 7 дню (показано на фиг. 5А только сплошной серой линией); в отличие от этого, все мыши, получающие однократную дозу (15 мг/кг) H1N14611N2 или H1N14612N2, выжили после введения дозы в 24 (фиг. 5А), 48 (фиг. 5В) или даже 72 часа (фиг. 5С) после инфицирования.

Во втором эксперименте мыши получали однократную субэффективную дозу 7 мг/кг (показано квадратами, пунктирной линией) или 15 мг/кг H1N14611N2 (показано кругами, пунктирной линией), контрольное IgG (показано треугольниками), 2 мг/кг озельтамивира ВІD в течение 5 дней (показано ромбами, сплошными линиями) или комбинацию из однократной дозы 7 (показано квадратами, сплошной линией) или 15 мг/кг H1N14611N2 (показано кругами, сплошной линией) и озельтамивира в течение 5 дней 96 часов после инфицирования с использованием 5 x MLD₅₀ A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2) (см. фиг. 6). Однократные дозы H1N14611N2, составляющие 15 мг/кг и 7 мг/кг, соответственно давали 100% и 80% выживаемость, а 80% мышей, которых лечили только с использованием 2 мг/кг озельтамивира, выжили. Комбинация H1N14611N2 с озельтамивиром увеличила выживаемость до 100% в обеих группах с введением доз H1N14611N2 (15 мг/кг или 7 мг/кг), демонстрируя, что данная комбинация позволяет использование более низких доз H1N14611N2 для достижения устойчивого лечебного эффекта (фиг. 6).

Подводя итог, H1N14611N2 и H1N14612N2 демонстрировали устойчивую эффективность в лечении мышей, инфицированных историческим штаммом вируса гриппа, и, кроме того, H1N14611N2 демонстрировало эффективность при введении в комбинации с озельтамивиром.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с гемагглютинином (НА) группы 2 вируса гриппа А, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющих комплементарности участка (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащихся в вариабельном участке тяжелой цепи (HCVR), содержащем аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 18; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в вариабельном участке легкой цепи (LCVR), содержащем аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 10 или 26.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащихся в HCVR, содержащем аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в LCVR, содержащем аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 10.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащихся в HCVR, содержащем аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 18; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в LCVR, содержащем аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 26.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент:

- (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- (b) связывается с НА группы 2 вируса гриппа А с константой диссоциации (K_D), составляющей менее 10^{-8} М, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) демонстрирует диссоциативный период полужизни ($t^{1/2}$), составляющий более 75 минут;
- (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов гриппа А группы 2, выбранных из штаммов H3N2 и H7N9, характеризующуюся показателем IC₅₀, составляющим соответственно менее 200 нМ и 500 нМ;
- (e) демонстрирует комплемент-опосредованный лизис инфицированных вирусом гриппа клеток, характеризующийся показателем EC₅₀, составляющим менее приблизительно 150 нМ;
- (f) демонстрирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении инфицированных вирусом клеток-мишеней при использовании репортерного биоанализа, характеризующуюся показателем EC₅₀, составляющим менее приблизительно 0,9 нМ;
- (g) демонстрирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении инфицированных вирусом клеток-мишеней в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), характеризующуюся показателем EC₅₀, составляющим менее приблизительно 0,180 нМ;

(h) демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, при введении через 24, 48, 72 или 96 часов после заражения вирусом; и/или

(i) демонстрирует повышение выживаемости животного, инфицированного вирусом гриппа, при введении в комбинации с озельтамивиром через 96 часов после инфицирования.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы, составляющей от приблизительно 7 до 15 мг/кг, начиная с дня 3 после инфицирования, обеспечивается защита млекопитающего от указанной инфекции в большей степени, чем инфицированного вирусом гриппа млекопитающего.

тающего, которому перорально вводили озельтамивир два раза в день в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг, начиная с дня 3 после инфицирования и продолжая до дня 7 после инфицирования.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где при введении млекопитающим, инфицированным вирусом гриппа, в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 15 мг/кг, через 96 часов после инфицирования, указанные млекопитающие характеризуются уровнем выживаемости, составляющим приблизительно 100%.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где при введении млекопитающим, инфицированным вирусом гриппа, в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 15 мг/кг, указанные млекопитающие характеризуются уровнем выживаемости, составляющим приблизительно 100%.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, проявляется дополнительный защитный эффект у млекопитающего при введении совместно с озельтамивиром через 96 часов после инфицирования.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где при введении млекопитающему, инфицированному вирусом гриппа, в виде однократной внутривенной дозы в диапазоне от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг проявляется дополнительный защитный эффект у млекопитающего при введении в комбинации с озельтамивиром перорально два раза в день в течение 5 дней в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие HCVR, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 18.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие LCVR, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 или 26.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие:

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 20;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 22;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 24;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 28;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 30;

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 32.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, содержащие:

(a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4,

(b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:6;

(c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:8;

(d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12;

(e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 и

(f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, содержащие:

(a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20,

(b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22;

(c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24;

(d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28;

(e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и

(f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32.

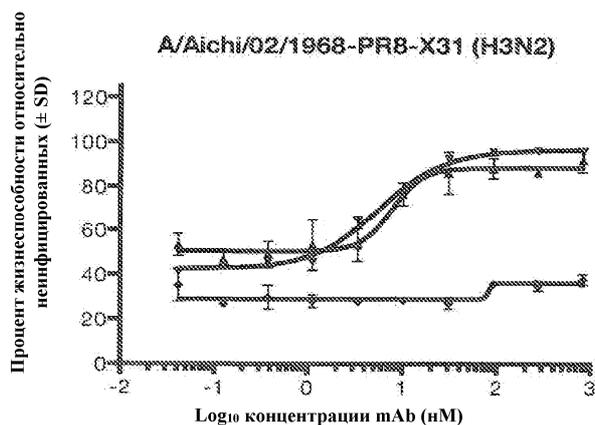
15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие HCVR, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2 и LCVR, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 10.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие HCVR, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 18 и LCVR, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 26.

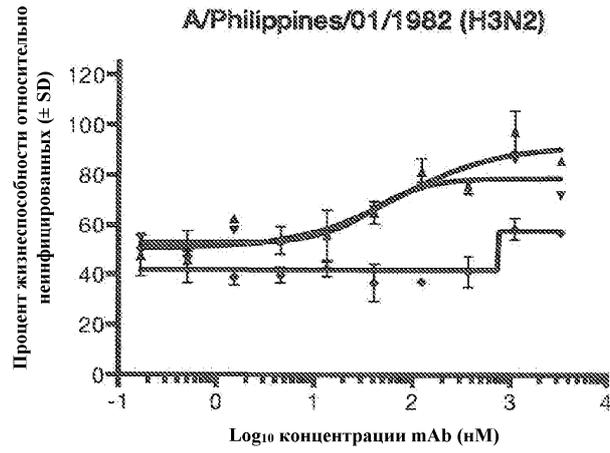
17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращает прикрепление вируса гриппа к клетке-хозяину и/или его проникновение в нее.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которые связываются с НА вируса гриппа, и фармацевтически приемлемые носитель или разбавитель.

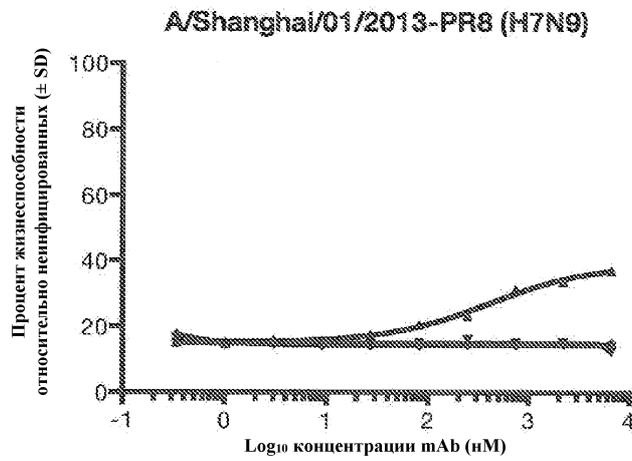
19. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела по п.1.
20. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела по п.1.
21. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR и LCVR антитела по п.1.
22. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.19-21.
23. Клетка, экспрессирующая вектор по п.22.
24. Способ предупреждения, лечения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции вирусом гриппа у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.1 или фармацевтической композиции, содержащей указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуждающемуся в этом субъекту.
25. Способ по п.24, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, кашля, болей в теле, ринореи, одышки, пневмонии и бронхита.
26. Способ по п.24, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят с профилактической целью нуждающемуся в этом субъекту.
27. Способ по п.26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят с профилактической целью субъекту, выбранному из группы, состоящей из иммунокомпрометированного индивидуума, взрослого человека пожилого возраста (в возрасте старше 65 лет), работника сферы здравоохранения и человека с нарушениями состояния здоровья или основным патологическим состоянием в анамнезе.
28. Способ по п.24, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.
29. Способ по п.28, где второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела, которое специфически связывается с НА группы 1 или группы 2 вируса гриппа, вакцины против гриппа, пищевой добавки и любого другого средства паллиативной терапии для лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа.
30. Способ по п.29, где второе терапевтическое средство вводят перорально.
31. Способ по п.29, где противовирусное лекарственное средство представляет собой озельтамивир.
32. Способ по п.31, где озельтамивир вводят до введения антитела, одновременно с ним или после него.
33. Способ по п.24, где фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутримышечно, интраназально или перорально.



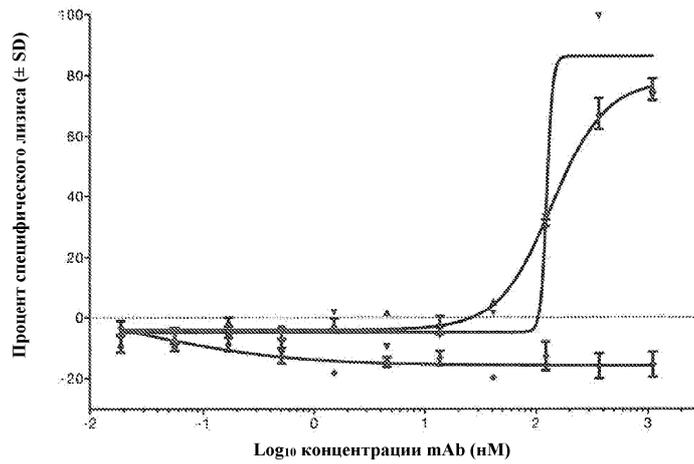
Фиг. 1А



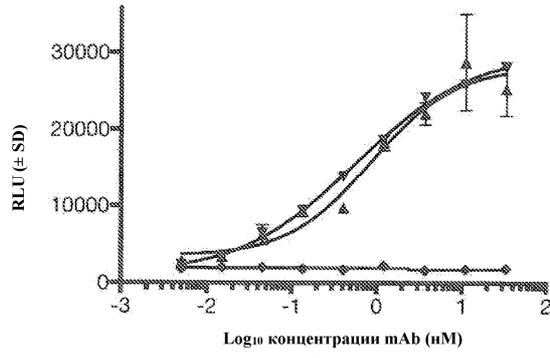
Фиг. 1В



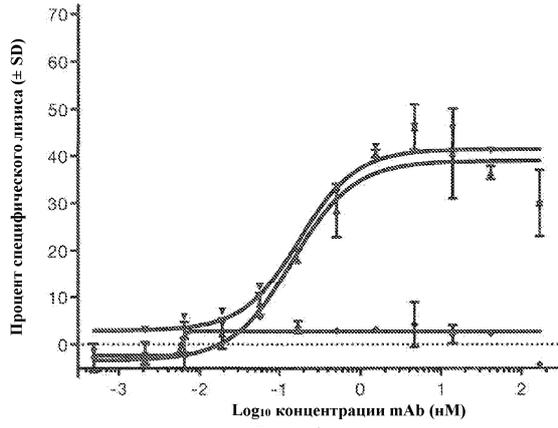
Фиг. 1С



Фиг. 2

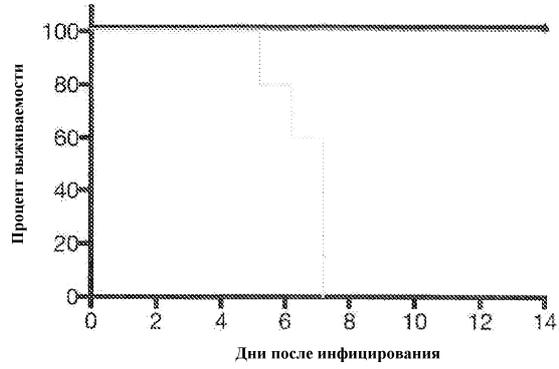


Фиг. 3



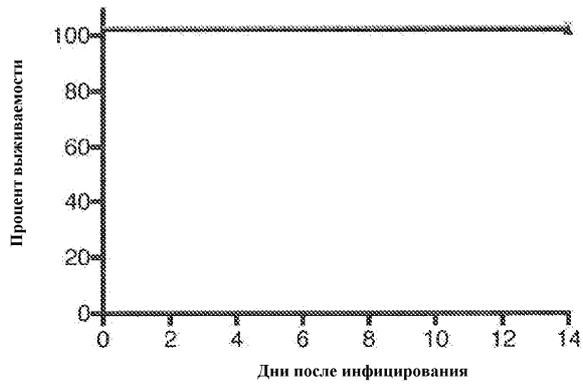
Фиг. 4

24 ч. п. и.



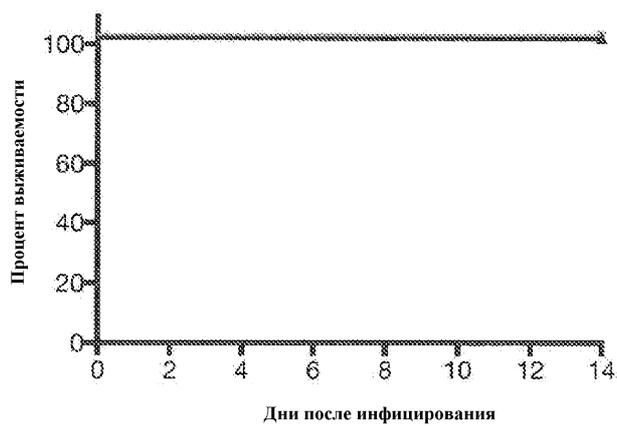
Фиг. 5А

48 ч. п. и.

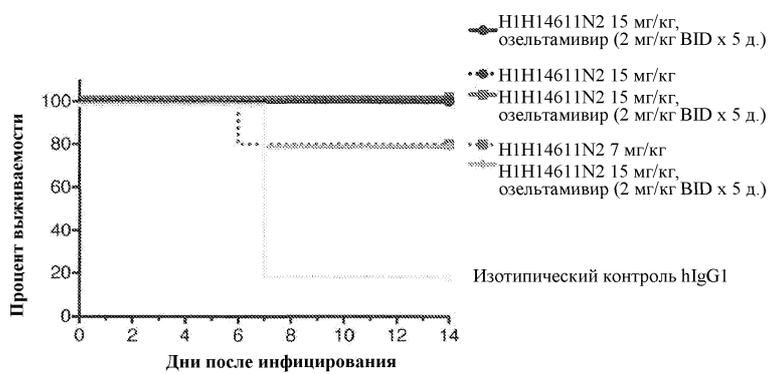


Фиг. 5В

72 ч. п. и.



Фиг. 5С



Фиг. 6

