

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392339 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.30(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 37/06 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2021.03.04

## (54) ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ АФУКОЗИЛИРОВАННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 2021-024790

(71)(72) Заявитель и изобретатель:

(32) 2021.02.19

МИМУРА ЮСУКЭ; МИМУРА ЮКА

(33) JP

(JP)

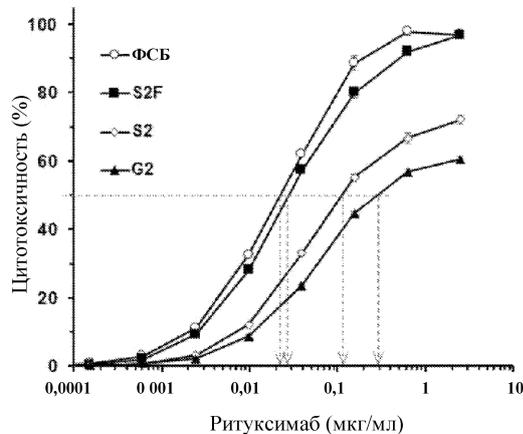
(86) PCT/JP2021/008404

(74) Представитель:

(87) WO 2022/176219 2022.08.25

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложено новое терапевтическое средство для лечения воспалительных заболеваний, таких как аутоиммунные заболевания. Согласно настоящему изобретению содержащееся в препарате антитело класса IgG включает сывороточное антитело класса IgG человека, в котором сахарная цепь, показанная ниже, соединена с аспарагином 297 (Asn297) в области Fc.



A1

202392339

202392339

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578991EA/10

### ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ АФУКОЗИЛИРОВАННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

#### Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к противовоспалительному препарату на основе афукозилированного иммуноглобулина и способу его получения.

#### Уровень техники

[0002] IVIG является одним из немногих вариантов лечения аутоиммунных заболеваний, таких как болезнь Кавасаки, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и синдром Гийена - Барре. IVIG получают путем фракционирования IgG из плазмы крови нескольких тысяч здоровых субъектов, ее очистки и концентрирования. Несмотря на то, что, согласно имеющимся данным, терапевтический эффект проявляется в области IgG-Fc (непатентные литературные источники 1, 2) и необходим Asn297-связывающий гликан IgG-Fc (непатентный литературный источник 2), механизм противовоспалительного действия остается неясным. Гликаны IgG-Fc необходимы для проявления эффекторных функций IgG, таких как активация рецептора Fcγ и комплемента, а удаление гликанов в значительной степени ухудшает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимую цитотоксичность и тому подобное (непатентный литературный источник 3). Гликаны IgG-Fc содержат фукозу, галактозу, сиаловую кислоту и т.п., связанные со структурой ядра, состоящей из семи сахаров, и характеризуются высокой степенью гетерогенности (фиг. 1). Согласно полученным данным, эти моносахариды, связанные с невосстанавливающим концом, обладают различной биологической активностью (непатентный литературный источник 4).

[0003] Было установлено, что удаление фукозы увеличивает ADCC приблизительно в сто раз (непатентные литературные источники 5, 6), а афукозилированные моноклональные антитела (могамулизумаб, обинутузумаб) уже применяются в клинической практике для лечения Т-клеточного лейкоза у взрослых и CD20-положительной фолликулярной лимфомы. Выявление эффективного компонента IVIG, оказывающего противовоспалительное действие при аутоиммунных заболеваниях, и выяснение механизма его действия также необходимо для разработки нового препарата на основе антител, способного заменить IVIG, спрос на который будет продолжать расти.

#### Литература по предшествующему уровню техники

##### Непатентные литературные источники

[0004] Непатентный литературный источник 1: Debre, M., et al., Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. Lancet, 1993. 342(8877): p. 945-9.

Непатентный литературный источник 2: Schwab, I. and F. Nimmerjahn, Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? Nat Rev Immunol, 2013.

13(3): p. 176-89.

Непатентный литературный источник 3: Mimura, Y., et al., Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell*, 2018. 9(1): p. 47-62.

Непатентный литературный источник 4: Zhang, P., et al., Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today*, 2016. 21(5): p. 740-65.

Непатентный литературный источник 5: Shinkawa, T., et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*, 2003. 278(5): p.3466-73.

Непатентный литературный источник 6: Shields, R.L., et al., Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*, 2002. 277(30): p. 26733-40.

### **Сущность изобретения**

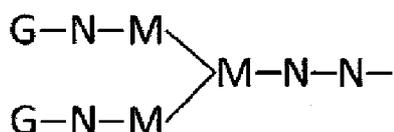
#### **Проблема, которая должна быть решена данным изобретением**

[0005] Настоящее изобретение создано с учетом этих проблем и преследует цель создания нового терапевтического препарата для лечения воспалительного заболевания, например аутоиммунного заболевания.

#### **Средства для решения проблемы**

[0006] Антитело класса IgG, содержащееся в противовоспалительном препарате на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему изобретению, получено из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором проиллюстрированный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc. В данном случае G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу.

[0007] [Схема 1]



[0008] Способ получения противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему изобретению включает: стадию удаления гликанов с помощью эндогликозидазы S (Endo S) на сывороточном антителе класса IgG человека для расщепления, в хитобиозном ядре, гликана, связанного с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc, и удаления гликана, исключая N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком Asn297, и фукозу, связанную с N-ацетилглюкозамин; стадию удаления фукозы с помощью α-L-фукозидазы (AlfC) для удаления фукозы, связанной с N-ацетилглюкозамин; и стадию переноса с помощью гликосинтазы (Endo S D233Q) оксазолированного гликана, полученного из галактозилгликопептида (GG-Ox), на N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc

сывороточного антитела класса IgG человека.

### **Эффекты от изобретения**

[0009] Настоящее изобретение может обеспечить создание нового терапевтического препарата для лечения воспалительного заболевания, например аутоиммунного заболевания.

### **Краткое описание фигур**

[0010] [Фиг. 1] Схема, иллюстрирующая гетерогенность гликанов IgG-Fc.

[Фиг. 2] Схема, иллюстрирующая разницу в проявлении киллерного действия NK-клеток между фукозилированным сывороточным IgG (S2F), в котором фукоза присутствует в гликанах области Fc антитела, и афукозилированным сывороточным IgG (S2), в котором фукоза отсутствует в гликанах области Fc антитела.

[Фиг. 3] Фотограмма ДСН-ПААГ-электрофореза, изображающая фукозилированный сывороточный IgG (S2F), в котором фукоза присутствует в гликанах области Fc антитела, и афукозилированный сывороточный IgG (S2), в котором фукоза отсутствует в гликанах области Fc антитела.

[Фиг. 4] Схема, иллюстрирующая стадии образования оксазолированного гликана (SG-Ox) из гликана, выделенного с использованием Endo S из сиалилгликопептида.

[Фиг. 5] Схема, иллюстрирующая методом высокоэффективной жидкостной хроматографии удаление фукозы в IgG (S2) из противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему примеру.

[Фиг. 6] Схема, иллюстрирующая, что нормальный сывороточный уровень IgG (95% фукозилированного IgG) подавляет ADCC в зависимости от концентрации.

[Фиг. 7] Схема, иллюстрирующая, что афукозилированный сывороточный IgG (S2) проявляет значительно более выраженное действие по подавлению антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), чем фукозилированный сывороточный IgG (S2F).

[Фиг. 8] Фотограмма, иллюстрирующая соответствующие результаты ДСН-электрофореза фукозилированного сывороточного IgG (S2F), афукозилированного сывороточного IgG (S2) и галактозилированного афукозилированного сывороточного IgG (G2).

[Фиг. 9] Схема, иллюстрирующая стадии образования оксазолированного гликана (GG-Ox) из гликана, выделенного с использованием Endo S из галактозилгликопептида.

[Фиг. 10] Схема, иллюстрирующая методом высокоэффективной жидкостной хроматографии удаление фукозы в IgG (S2) и IgG (G2) из противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему примеру.

[Фиг. 11] Схема, иллюстрирующая, что нормальный сывороточный уровень IgG (95% фукозилированного IgG) подавляет ADCC в зависимости от концентрации.

[Фиг. 12] Схема, иллюстрирующая, что афукозилированный сывороточный IgG (G2) проявляет значительно более выраженное действие по подавлению антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), чем фукозилированный сывороточный IgG (S2F) и афукозилированный сывороточный IgG (S2).

[Фиг. 13] Схема, иллюстрирующая противовоспалительное действие галактозилированного афукозилированного IgG (G2) на мышей с артритом, вызванным антителами к коллагену.

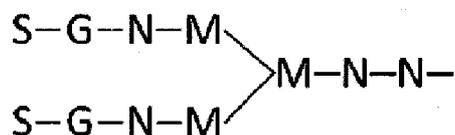
[Фиг. 14] Схема, иллюстрирующая содержание белка острой фазы IL-6 (A) и С-реактивного белка (СРБ) (B) у мышей с артритом, вызванным антителами к коллагену, которым вводили IgG.

### Вариант осуществления изобретения

[0011] Ниже приводится конкретное описание варианта осуществления настоящего изобретения со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Этот вариант осуществления служит для облегчения понимания принципов настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения не ограничивается следующим вариантом осуществления, и другие варианты осуществления, в которых специалист в данной области техники делает соответствующие замены в конфигурации следующего варианта осуществления, также включены в объем настоящего изобретения.

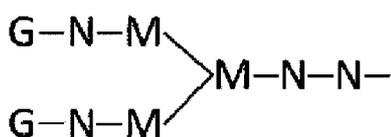
[0012] Антитело класса IgG, содержащееся в противовоспалительном препарате на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему варианту осуществления изготовлено из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором проиллюстрированный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc. В данном случае S представляет собой сиаловую кислоту, G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу.

[0013] [Схема 2]



[0014] Кроме того, антитело класса IgG, содержащееся в противовоспалительном препарате на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему варианту осуществления изобретения получено из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором проиллюстрированный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc. В данном случае G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу.

[0015] [Схема 3]



[0016] Иммуноглобулины включают антитела, фрагменты антител (scFv, Fab, Fc, F(ab')<sub>2</sub>) и другие генетически сконструированные фрагменты антител, но не ограничиваются ими. Иммуноглобулины, то есть антитела, представляют собой группу гликопротеинов, присутствующих в сыворотке крови, тканях и биологических жидкостях всех млекопитающих. IgG (иммуноглобулин G) составляет приблизительно 75-85%

иммуноглобулинов в нормальной сыворотке крови человека. Гликаны также играют важную роль в поддержании общей трехмерной структуры IgG. Шестнадцать типов гликанов присутствуют в виде нейтрализованных гликанов. Гликановая структура IgG представлена весьма гетерогенной смесью гликанов, однако относительное соотношение этих шестнадцати типов у здоровых субъектов остается в значительной степени постоянным. Следует отметить, что в случае пациентов с миеломой и ревматизмом соотношение гликанов весьма специфично.

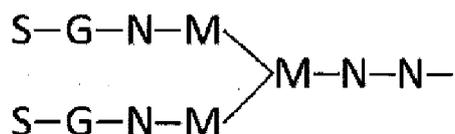
[0017] Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) представляет собой направленную клеточную цитотоксичность, индуцируемую антителозависимым образом путем связывания связанного с клеткой-мишенью антитела с рецепторами Fc на эффекторных клетках, таких как естественные клетки-киллеры (NK-клетки) или макрофаги. Считается, что ADCC является одним из наиболее важных видов активности в проявлении лекарственной эффективности в фармацевтических препаратах на основе антител.

[0018] Два N-гликозид-связанных гликана связаны с областью Fc одной молекулы антитела класса IgG. Эти N-гликозид-связанные гликаны антитела представляют собой сложные двухцепочечные гликаны, основной структурой которых является маннозил-хитобиозная структура ядра (маннозил-хитобиозное ядро). Со стороны невозстанавливающего конца имеется разнообразие в присутствии или отсутствии галактозы и сиаловой кислоты. На восстанавливающем конце имеется разнообразие в присутствии или отсутствии фукозы.

[0019] Удаление остатка фукозы из N-ацетилглюкозамина восстанавливающего конца N-гликозид-связанного сложного гликана, связанного с областью Fc антитела, повышает аффинность к рецептору IIIa Fcγ. В настоящем описании афукозилированный IgG с сиаловой кислотой на конце может быть представлен как «IgG (S2)» (или просто «афукозилированный IgG»), а афукозилированный IgG с галактозой на конце может быть представлен как «IgG (G2)» (или просто «галактозилированный афукозилированный IgG»).

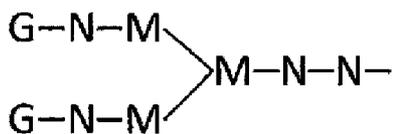
[0020] IgG (S2) имеет структуру, в которой гликан, изображенный ниже, связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc. В данном случае S представляет собой сиаловую кислоту, G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу.

[0021] [Схема 4]



[0022] IgG (G2) имеет структуру, в которой гликан, изображенный ниже, связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc. В данном случае G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу.

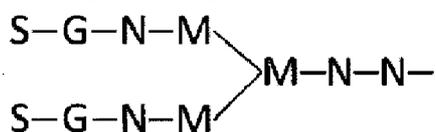
[0023] [Схема 5]



[0024] Следует отметить, что содержащееся антитело класса IgG, полученное из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором предварительно определенный гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc, означает, что сывороточное антитело класса IgG человека, в котором предварительно определенный гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc, содержится в количестве от 95% до 100%, предпочтительно в количестве от 98% до 100% и наиболее предпочтительно в количестве 100% в антителе класса IgG, содержащемся в препарате на основе иммуноглобулина.

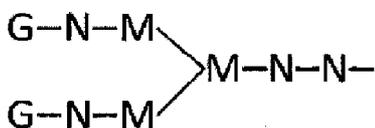
[0025] Таким образом, противовоспалительный препарат на основе афукозилированного иммуноглобулина, в котором содержащееся антитело класса IgG, полученное из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором проиллюстрированный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc (в данном случае S представляет собой сиаловую кислоту, G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу), означает, что сывороточное антитело класса IgG человека, в котором изображенный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc, содержится в количестве от 95% до 100%, предпочтительно в количестве от 98% до 100% и наиболее предпочтительно в количестве 100% в антителе класса IgG, содержащемся в препарате на основе иммуноглобулина.

[0026] [Схема 6]



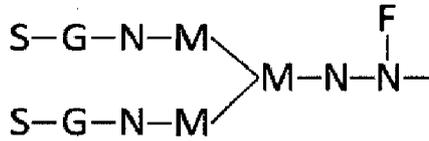
[0027] Кроме того, противовоспалительный препарат на основе афукозилированного иммуноглобулина, в котором содержащееся антитело класса IgG, полученное из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором проиллюстрированный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc (в данном случае G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу) означает, что сывороточное антитело класса IgG человека, в котором проиллюстрированный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc, содержится в количестве от 95% до 100%, предпочтительно в количестве от 98% до 100% и наиболее предпочтительно в количестве 100% в антителе класса IgG, содержащемся в препарате на основе иммуноглобулина.

[0028] [Схема 7]



[0029] При этом фукозилированный IgG может быть представлен как «IgG (S2F)». IgG (S2F) имеет структуру, в которой гликан, изображенный ниже, связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc. В данном случае S представляет собой сиаловую кислоту, G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, M представляет собой маннозу, а F представляет собой фукозу.

[0030] [Схема 8]



[0031] Как показано на фиг. 2, фукозилированный IgG не может ингибировать взаимодействие между комплексом аутоантитело-антиген и рецептором IIIa Fcγ на NK-клетке. Тем не менее, считается, что афукозилированный IgG (афукозилированный сывороточный IgG, проиллюстрированный на схеме B фиг. 2, представляет собой IgG (S2) или IgG (G2)) прочно связывается с рецептором IIIa Fcγ на NK-клетке, что приводит к подавлению киллерного действия NK-клетки и, как следствие, к подавлению воспаления.

[0032] Если препарат на основе иммуноглобулина по настоящему изобретению представляет собой жидкий препарат, то его используют как таковой или разбавляют соответствующим растворителем (например, дистиллированной водой для инъекций, физиологическим раствором или раствором глюкозы). Если препарат является сухим препаратом, то его используют путем сублимационной сушки раствора иммуноглобулина и последующего растворения его в соответствующем растворителе (например, дистиллированной воде для инъекций) в момент применения.

[0033] Путь введения препарата на основе иммуноглобулина по настоящему изобретению как правило инъекционный. Особенно предпочтительным является внутривенное введение. Стандартная доза препарата на основе иммуноглобулина по настоящему изобретению составляет от 50 до 1000 мг/день иммуноглобулина на 1 кг массы тела, вводимого внутривенно в течение от одного до нескольких дней подряд. Достаточно увеличить или уменьшить количество вводимого препарата в зависимости от симптомов, пола, массы тела и т. п.

[0034] Раствор иммуноглобулина по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемую добавку (например, носитель, эксципиент или разбавитель), стабилизатор или фармацевтически необходимый компонент, обычно используемый в фармацевтическом продукте, в пределах, не нарушающих объект настоящего изобретения.

[0035] В качестве стабилизатора можно использовать моносахарид, такой как глюкоза; дисахарид, такой как сахароза или мальтоза; сахарный спирт, такой как маннит или сорбит; нейтральную соль, такую как хлорид натрия; аминокислоту, такую как глицин; неионогенное поверхностноактивное вещество, например, полиэтиленгликоль, полиоксиэтилен-полиоксипропиленовый сополимер (Pluronic (зарегистрированная торговая марка)) или полиоксиэтилensorбитановый эфир жирной кислоты (Tween); и т.п.,

приведенные в качестве примера. Стабилизатор предпочтительно добавляют в количестве приблизительно от 1 до 10 масс./об.%.

[0036] Заболевания, при которых применяется препарат на основе иммуноглобулина по настоящему изобретению, особо не ограничиваются. Однако, в качестве примера можно привести болезнь Кавасаки, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Гийена - Барре, рассеянный склероз, хронический ревматоидный артрит, системную красную волчанку, пемфигус, буллезный пемфигоид, миастению гравис, ANCA-ассоциированный васкулит, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный приобретенный дефицит фактора VIII, синдром ригидного человека, мультифокальную нейропатию, болезнь Бехчета, язвенный колит, болезнь Крона, синдром Рейтера, полимиозит, дерматомиозит, ограниченную склеродермию, системную склеродермию, синдром Шегрена, заболевание, ассоциированное с образованием антител к базальной мембране клубочков, первичный склерозирующий холангит, антифосфолипидный синдром, токсический эпидермальный некролиз, болезнь «трансплантат против хозяина» и сепсис.

[0037] Следует отметить, что препараты на основе антител, в которых фукоза удалена из гликанов области Fc моноклонального антитела класса IgG, разрабатывают с целью усиления антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (например, могамулизумаб (название препарата: Poteligeo™)). Традиционные афукозилированные антитела представляют собой антиген-специфические моноклональные антитела, полученные из клетки-хозяина млекопитающего, имеющей управляемый ген, связанный с гликанами. Эти антитела адаптированы к злокачественным опухолям. В противоположность этому, иммуноглобулин по настоящему изобретению в данной заявке ферментативно удаляет фукозу из неспецифического антитела класса IgG, полученного из сыворотки крови, и затем переносит однородные гликаны с помощью химической ферментативной реакции. Данный иммуноглобулин адаптирован для лечения аутоиммунного заболевания. То есть препарат на основе иммуноглобулина по изобретению в данной заявке используется для подавления нежелательного иммунного ответа аутоантител.

[0038] Способ получения противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему варианту осуществления включает: стадию удаления гликанов, заключающуюся в расщеплении на хитобиозном ядре гликана, связанного с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc сывороточного антитела класса IgG человека, и удалении гликана, исключая N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком Asn297; стадию удаления фукозы, заключающуюся в удалении фукозы, связанной с N-ацетилглюкозамином; и стадию переноса, заключающуюся в использовании гликосинтазы (Endo S D233Q) для переноса оксазолированного гликана, полученного из сиалилгликопептида желтка (SG-Ox), на N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc сывороточного антитела класса IgG человека.

[0039] Способ получения противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему варианту осуществления включает: стадию удаления гликанов с помощью эндогликозидазы S (Endo S) на сывороточном антителе класса IgG человека для расщепления, в хитобиозном ядре, гликана, связанного с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc, и удаления гликана, исключая N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком Asn297, и фукозу, связанную с N-ацетилглюкозамином; стадию удаления фукозы с помощью  $\alpha$ -L-фукозидазы (AlfC) для удаления фукозы, связанной с N-ацетилглюкозамином; и стадию переноса с помощью гликосинтазы (Endo S D233Q) оксазолированного гликана, полученного из галактозилгликопептида желтка (GG-Ox), на N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc сывороточного антитела класса IgG человека.

[0040] Ферментом, расщепляющим гликан, связанный с остатком аспарагина 297 (Asn297) в области Fc на хитобиозном ядре, является эндогликозидаза S (Endo S).

[0041] Ферментом, который удаляет фукозу, связанную с N-ацетилглюкозамином, является  $\alpha$ -L-фукозидаза (AlfC). В качестве  $\alpha$ -L-фукозидазы можно использовать 1,2- $\alpha$ -L-фукозидазу, 1,3- $\alpha$ -L-фукозидазу или 1,6- $\alpha$ -L-фукозидазу. В данном случае предпочтительно использовать 1,6- $\alpha$ -L-фукозидазу.

[0042] Оксазолированный гликан (SG-Ox или GG-Ox) получают, подвергая восстановительный конец сиалилгликана дегидратационной конденсации.

[0043] Фермент, который переносит SG-Ox или GG-Ox на удаляемый с помощью гликана IgG, является гликосинтаза (Endo S D233Q).

### **Примеры**

[0044] 1. Получение противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина

#### 1a-1. Очистка полученного из сыворотки IgG

20 мл сыворотки, полученной из крови здорового субъекта, подвергали диализу в 0,01 М фосфатном буферном растворе (pH 7,0), а затем вносили в анионообменную колонку с диэтиламиноэтилцеллюлозой (DEAE), уравновешенную тем же буферным раствором (DE52, Whatman Biosystems, Чалфонт, Сент-Джайлс, Великобритания) (1 × 30 см) для сбора IgG, включенного в проточную фракцию. Гликановая структура сывороточного IgG была проанализирована методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано ниже (фиг. 5-A), и было подтверждено, что 95% или более было фукозилировано.

#### [0045] 1a-2. Дегликозилирование сывороточного IgG

В качестве эндогликозидазы, расщепляющей Fc-связанный гликан IgG, использовали Endo S. Гидролиз осуществлялся между двумя N-ацетилглюкозаминами хитобиозного ядра гликана, после чего осуществлялось дегликозилирование с выделением двух сахаров - N-ацетилглюкозамина и фукозы. Дегликозилированный IgG очищали с помощью Protein G Sepharose 4 (GE).

#### [0046] 1a-3. Дефукозилирование сывороточного IgG

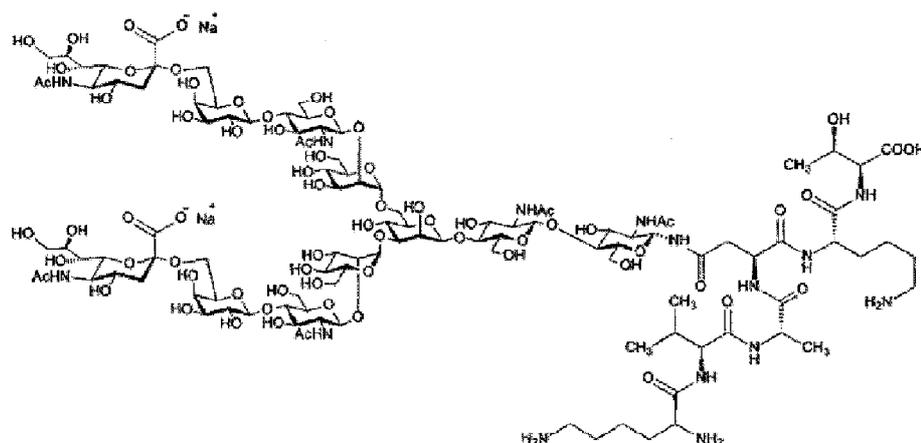
Для удаления фукозы использовали  $\alpha$ -L-фукозидазу (AlfC). Последовательность

ДНК вектора экспрессии данного фермента уже описана (последовательность № 1) и была экспрессирована в соответствии с данными из литературных источников в BL21(DE3) *E. coli*. Для удаления фукозы AlfC вводили в реакцию с IgG, дегликозилированным Endo S, в 50 mM трис-HCl (pH 7,4) в течение ночи при 37°C.

[0047] 1a-4. Образование оксазолина сиалилгликана (SG-Ox)

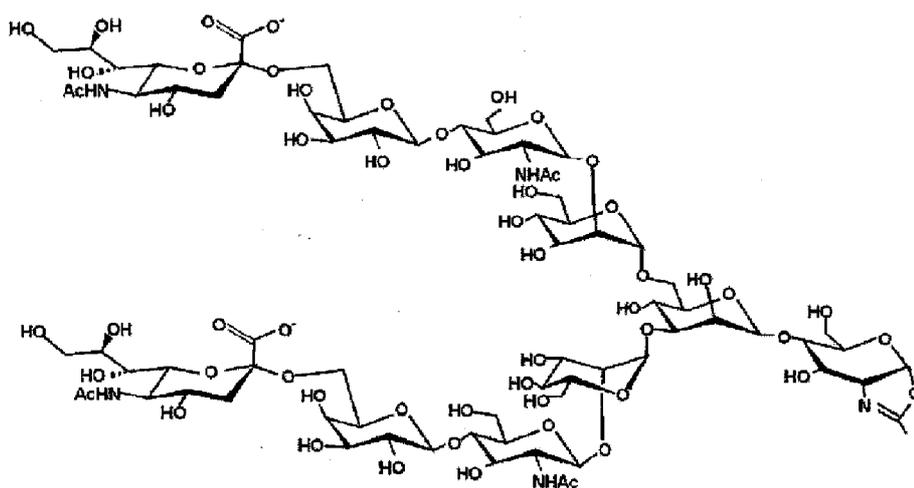
Гликаны проиллюстрированного ниже сиалилгликопептида (10 мг, TCI) расщепляли с помощью Endo S в 50 mM фосфатном буферном растворе (pH 6,0). Добавляли 2-Хлор-1,3-диметилимидазолиний хлорид (TCI) и триэтиламин. Оставляли на 1 час при 0°C и получали SG-Ox реакцией дегидратационной конденсации восстанавливающего конца.

[0048] [Схема 9]



[0049] На фиг. 4 показаны стадии образования оксазолированного гликана (SG-Ox) из сиалилового гликана, выделенного с помощью Endo S. Структура SG-Ox показана ниже.

[0050] [Схема 10]

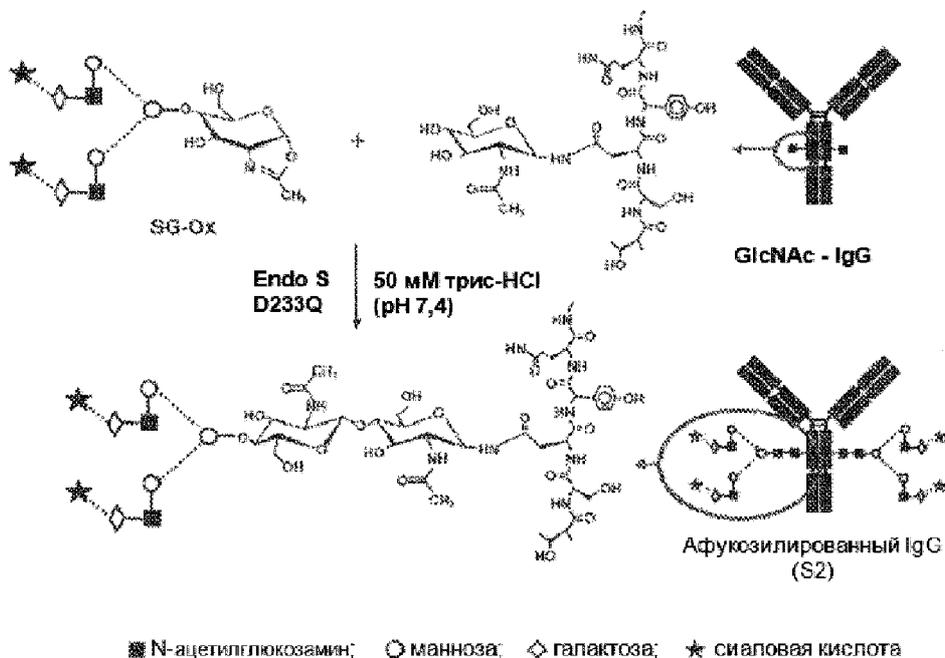


[0051] 1a-5. Получение афукозилированного IgG

Последовательность ДНК вектора экспрессии гликозидотрансферазы Endo S D233Q описана в литературных источниках (последовательность № 2) и была экспрессирована в BL21(DE3) *E. coli*. Реакцию переноса гликанов проводили с использованием SG-Ox путем инкубации в течение 3 часов при 30°C в 50 mM трис-HCl (pH 7,4). В результате был получен противовоспалительный препарат на основе афукозилированного иммуноглобулина по

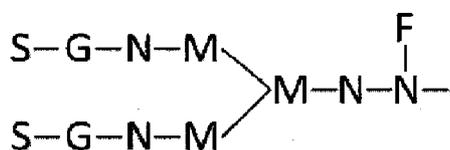
настоящему примеру. Этот афукозилированный IgG по настоящему примеру может быть представлен как «IgG (S2)». Было подтверждено, что чистота как IgG (S2), так и IgG (S2F), т.е. фукозилированного IgG, составляет 95% или более по результатам ДСН-ПААГ-электрофореза (фиг. 3). Ниже показана реакция переноса гликана SG-Ox на GlcNAc-IgG.

[0052] [Схема 11]



[0053] Для подтверждения модификации гликанов в противовоспалительном препарате на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему примеру IgG (S2) и IgG (S2F), в которых гликаны были заменены, подвергали расщеплению N-гликозидазой F для выделения гликанов. Затем проводили флуоресцентное мечение 2-аминобензамидом и анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Следует отметить, что IgG (S2F) представляет собой фукозилированный IgG из сравнительного примера. В частности, речь идет о сывороточном IgG человека, в котором иллюстрируемый ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc.

[0054] [Схема 12]



[0055] Как показано на фиг. 5, гликаны контрольного IgG в значительной степени содержат фукозу. Однако можно подтвердить, что фукоза удалена в IgG (S2) противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по настоящему примеру.

[0056] 1b. Подавляющее ADCC (противовоспалительное) действие афукозилированного сывороточного IgG

Противовоспалительное действие противовоспалительного препарата на основе

афукозилированного иммуноглобулина по настоящему примеру было подтверждено следующим способом.

[0057] В качестве предварительного теста исследовали влияние нормального сывороточного IgG (95% фукозилированного IgG; контрольный IgG, показанный на схеме А фиг. 5) на ADCC с помощью набора для репортерного биологического анализа ADCC (Promega). Клетки-мишени были помечены гаптенем (4-гидрокси-3-иодо-5-нитрофенацетилем) и сенсибилизированы антигаптенным моноклональным антителом класса IgG (от 0,001 до 3 мкг/мл) (фиг. 6).

[0058] Величина ADCC антигаптенного IgG определяется концентрацией антигаптенного IgG, способной вызывать гибель клеток-мишеней (цитотоксичность; фиг. 6, ось Y) в количестве 50% от максимального уровня (EC50). Можно предположить, что чем ниже EC50, тем выше ADCC специфического антитела. При добавлении сывороточного IgG в концентрациях 0,01, 0,1, 1 и 8 мг/мл в систему измерения ADCC для сравнения EC50 антигаптенного IgG было показано, что чем выше концентрация добавленного сывороточного IgG, тем сильнее возрастает EC50 (смещается вправо по оси X) и тем сильнее подавляется ADCC (фиг. 6).

[0059] Между тем, чтобы выяснить, есть ли разница в подавляющем ADCC действии между афукозилированным IgG (S2), представляющим собой модифицированный гликанами сывороточный IgG, и фукозилированным IgG (S2F), сравнивали ADCC IgG к CD20 в их присутствии (фиг. 7). Концентрации S2 и S2F составляли 0,1 мг/мл. Для S2F значение EC50 было таким же, как и в случае контроля (0,2 мкг/мл), и подавляющее действие не проявлялось (фиг. 7). В то же время в присутствии S2 значение EC50 составило > 3 мкг/мл, концентрация не менее чем в 15 раз выше (фиг. 7). Таким образом, можно утверждать, что S2 проявлял подавляющее ADCC действие не менее чем в 15 раз сильнее, чем S2F. Соответственно, при использовании афукозилированного IVIG можно ожидать проявления противовоспалительного эффекта при введении меньшего количества препарата, чем при применении обычного IVIG. Более того, противовоспалительный эффект может проявиться даже в том случае, когда обычный IVIG выявляется неэффективным.

[0060] 2. Получение противовоспалительного препарата на основе галактозилированного афукозилированного иммуноглобулина

#### 2а-1. Очистка полученного из сыворотки IgG

20 мл сыворотки, полученной из крови здорового субъекта, подвергали диализу в 0,01 М фосфатном буферном растворе (pH 7,0), а затем вносили в анионообменную колонку с диэтиламиноэтилцеллюлозой (DEAE), уравновешенную тем же буферным раствором (DE52, Whatman Biosystems, Чалфонт, Сент-Джайлс, Великобритания) (1 × 30 см) для сбора IgG, включенного в проточную фракцию. Было подтверждено, что чистота составляет 95% и более по результатам ДСН-ПААГ-электрофореза (фиг. 8, дорожка 1).

#### [0061] 2а-2. Расщепление гликана сывороточного IgG

В качестве эндогликозидазы, расщепляющей Fc-связанный гликан IgG,

использовали Endo S. Последовательность ДНК вектора экспрессии Endo S описана и была экспрессирована в BL21(DE3) *E. coli*. С помощью Endo S, иммобилизованной на активированных бромистым цианогеном гранулах Sepharose 4В проводили гидролиз между двумя N-ацетилглюкозаминами хитобиозного ядра гликана, после чего осуществлялось дегликозилирование с выделением двух сахаров - N-ацетилглюкозамина и фукозы. Дегликозилированный IgG очищали с помощью Protein G Sepharose 4 (GE).

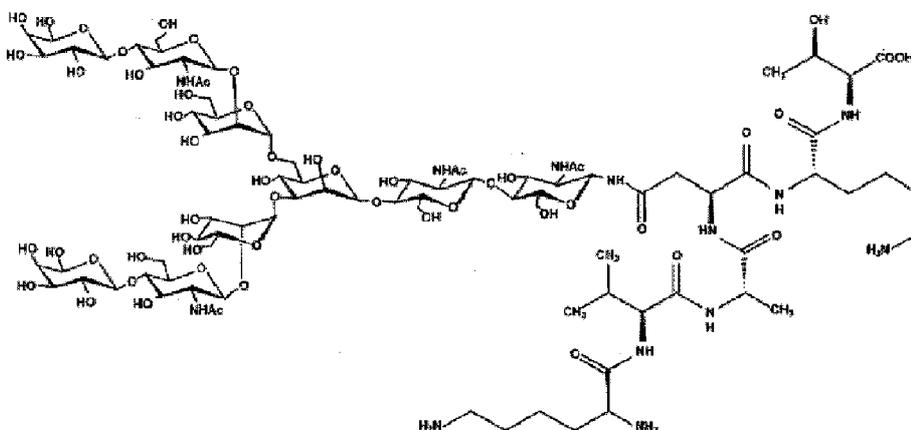
#### [0062] 2a-3. Дефукозилирование сывороточного IgG

Для удаления фукозы использовали  $\alpha$ -L-фукозидазу (AlfC). Последовательность ДНК вектора экспрессии данного фермента уже описана (последовательность № 1) и была экспрессирована в соответствии с данными из литературных источников в BL21(DE3) *E. coli*. Для удаления фукозы AlfC вводили в реакцию с IgG, дегликозилированным Endo S, в 50 мМ трис-HCl (pH 7,4) в течение ночи при 37°C.

#### [0063] 2a-4. Образование галактозилгликан-оксазолина (GG-Ox)

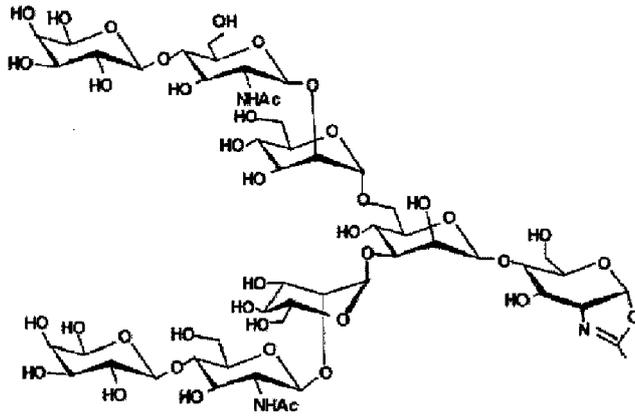
Сиалилгликопептид (10 мг, TCI) вводили в реакцию с сиалидазой (Roche) и иммобилизованной на сефарозе Endo S в 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 6,0) в течение ночи при 37°C. В качестве промежуточного тела использовали галактозилгликопептид, изображенный на ниже. При расщеплении его гликанов образовывался галактозилгликан. Кроме того, добавляли 2-хлор-1,3-диметилимидазолиний хлорид (TCI) и триэтиламин. Оставляли на 1 час при 0°C и получали GG-Ox реакцией дегидратационной конденсации восстанавливающего конца. Очистку GG-Ox проводили с помощью целлюлозной колонки (Sigma-Aldrich). Следует отметить, что в приведенном выше примере галактозилгликопептид был получен путем десиалилирования, в ходе которого на сиалилгликопептид воздействует сиалидаза. Однако можно проводить десиалилирование и без использования фермента. Например, галактозилгликопептид может быть получен путем десиалилирования, в ходе которого сиалилгликопептид подвергается термообработке при pH от 1 до 2.

#### [0064] [Схема 13]



[0065] На фиг. 9 показаны стадии образования GG-Ox из гликана, выделенного с помощью Endo S. Структура GG-Ox показана ниже.

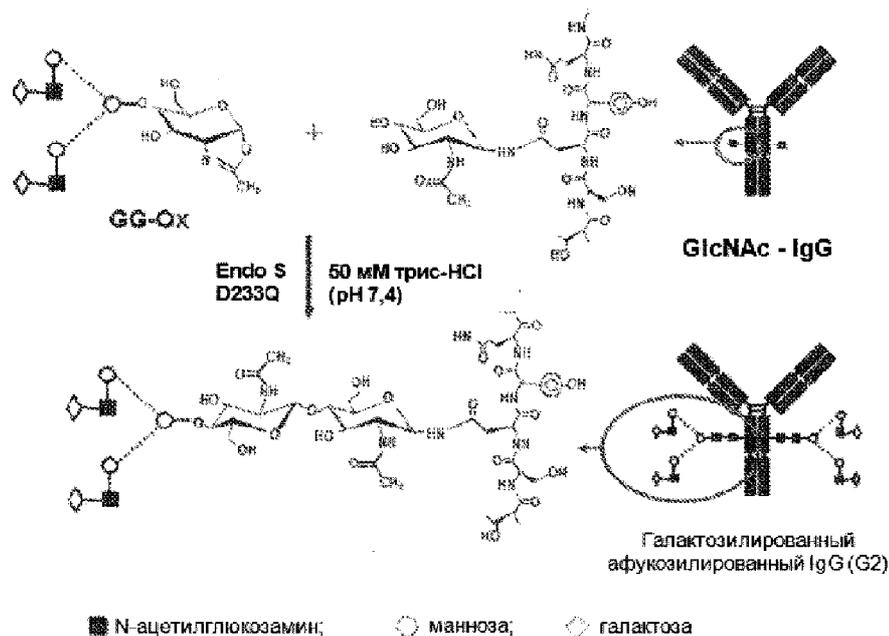
[0066] [Схема 14]



[0067] 2a-5. Получение галактозилированного афукозилированного IgG

Последовательность ДНК вектора экспрессии гликозилтазы Endo S D233Q описана в литературных источниках и была экспрессирована в BL21(DE3) *E. coli*. Реакцию переноса гликанов проводили с использованием GG-Ox путем инкубации в течение 4 часов при 30°C в Endo S D233Q и 50 mM трис-HCl (pH 7,4). В результате был получен противовоспалительный препарат на основе галактозилированного афукозилированного иммуноглобулина по настоящему примеру. Этот галактозилированный афукозилированный IgG по настоящему примеру может быть представлен как «IgG (G2)». Для подтверждения модификации гликанов IgG (S2, S2F, G2), в которых гликаны были заменены, подвергали расщеплению N-гликозидазой F для выделения гликанов. Затем проводили флуоресцентное мечение 2-аминобензамидом и анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (фиг. 10). Ниже показана реакция переноса гликана GG-Ox на GlcNAc-IgG.

[0068] [Схема 15]



[0069] 2b. Подавляющее ADCC (противовоспалительное) действие

галактозилированного афукозилированного иммуноглобулина

2b-1. Подавляющее ADCC (противовоспалительное) действие *in vitro*

Следующим способом было установлено, что сывороточный IgG, удаленный из фукозы, обладает противовоспалительным действием, а наличие галактозы на конце усиливает это действие. В качестве предварительного теста было исследовано влияние присутствия нормального сывороточного IgG (IVIg, 95% фукозилированный; фиг. 10A) на ADCC с использованием набора для репортерного биологического анализа ADCC (Promega). Клетки-мишени (клетки Raji) сенсibilizировали антителом к CD20 (ритуксимаб) (от 0,001 до 3 мкг/мл; фиг. 11). О величине ADCC свидетельствует концентрация антитела, способная вызвать гибель клеток-мишеней (цитотоксичность; ось Y на фиг. 11) в количестве 50% от максимального уровня (EC50; ось X на фиг. 11). Можно предположить, что чем меньше значение EC50, тем выше ADCC. При добавлении в систему измерения ADCC сывороточного IgG (IVIg) в концентрациях 0, 0,1, 1 и 10 мг/мл для сравнения значений EC50 было показано, что они составляют соответственно 0,026, 0,032, 0,6 и > 2 мкг/мл; чем выше концентрация IVIg, тем больше возрастает значение EC50 и тем сильнее подавляется ADCC (фиг. 11).

[0070] Затем измеряли ADCC в присутствии модифицированного гликаном афукозилированного IgG (S2), галактозилированного афукозилированного IgG (G2), агалактозилированного афукозилированного IgG (G0) и фукозилированного IgG (S2F) в концентрации 0,1 мг/мл (фиг. 12). Значения EC50 составили соответственно 0,023, 0,028, 0,08, 0,12 и 0,3 мкг/мл в присутствии ФСБ (отрицательный контроль), S2F, G0, S2 и G2. Наиболее сильное ингибирующее действие проявилось в присутствии G2 (фиг. 12), что соответствует относительным значениям ADCC, равным 100%, 82%, 29%, 19% и 7,6%. Таким образом, можно утверждать, что G2 проявлял подавляющее ADCC действие, соответственно, в 11 и 2,5 раза большее, чем S2F и S2. Таким образом, используя галактозилированный афукозилированный IVIg, можно ожидать противовоспалительного эффекта от меньшего количества вводимого препарата по сравнению с обычным IVIg. Кроме того, рецептор IIIa Fcγ имеет два аллотипа, причем рецептор IIIa Fcγ, включающий валин 158 (Val158), обладает более высокой аффинностью к IgG и более высокой ADCC, чем рецептор IIIa Fcγ, включающий фенилаланин 158 (Phe158). Данные результаты были получены на эффекторных клетках, экспрессирующих рецептор Fcγ IIIa-Val158. Однако столь же сильное ингибирующее ADCC действие наблюдалось и в случае рецептора Fcγ IIIa-Phe158. Таким образом, G2 эффективен у пациентов обоих аллотипов, и можно ожидать, что сильное противовоспалительное действие будет проявляться даже у тех пациентов, у которых обычный IVIg не оказывает никакого эффекта.

[0071] 2b-2. Подавляющее ADCC (противовоспалительное) действие *in vivo*

Для изучения того, проявляют ли афукозилированные IgG, обладающие подавляющим ADCC действием (S2, G2) (фиг. 12), противовоспалительное действие даже *in vivo*, использовали мышей на модели артрита, вызванного антителами к коллагену (CAIA). В день 0 мышам линии DBA/1J (самки, возраст 8 недель; Japan SLC) внутривенно

вводили коктейль коллаген-антитело (Chondrex Inc., номер по каталогу 53010) (1,5 мг/мышь). В день 3 внутривенно вводили липополисахарид (ЛПС; 12,5 мкг/мышь) для индукции артрита. Для лечения за 1 час до введения ЛПС внутривенно вводили IgG (S2, S2F, G2; фиг. 8, 10) (0,1 г/кг массы тела, n=3/группа). Сывороточный IgG (IVIg) вводили в двух группах доз - низкодозовой (0,1 г/кг массы тела) и высокодозовой (1 г/кг массы тела). Группа, которой вводили высокую дозу IVIG, является положительным контролем; такая доза используется для лечения воспалительных заболеваний у людей. В качестве отрицательного контроля использовали фосфатный буферный раствор (ФСБ, 0,33 мл). В дни 3, 4, 6 и 8 тяжесть артрита оценивали по пятибалльной шкале (0: без изменений; 1: отек пальцев; 2: отек пальцев и подошвы; 3: отек всей стопы; 4: тяжелый отек). В итоге был получен общий балл для всех четырех конечностей. В день 8 группа, получавшая G2, и группа, получавшая высокую дозу IVIG, имели одинаково низкие показатели артрита (фиг. 13). В то же время в группах, получавших S2, S2F и низкую дозу IVIG, наблюдался высокий показатель артрита, как и в группе, получавшей ФСБ. В день 8 осуществляли забор крови путем пункции сердца под наркозом изофлюраном и определяли уровень воспалительных цитокинов - интерлейкина 6 (IL-6) и С-реактивного белка (СРБ), которые являются белками острой фазы. В группе, получавшей ФСБ, концентрация IL-6 в сыворотке крови была самой высокой и составляла 10,9 пг/мл. В здоровой (нормальной) группе и группе, получавшей G2, значения были низкими - 1,3 пг/мл и 0,7 пг/мл, соответственно (фиг. 14А). В то же время в группах, получавших S2, S2F и IVIG, эти показатели были в 2-3 раза выше, чем в группе здоровых животных. Что касается сывороточного уровня СРБ, то в группе, получавшей G2, он также был низким, как и в группе здоровых животных (фиг. 14В). Таким образом, удалось подтвердить, что G2 проявляет выраженное противовоспалительное действие даже *in vivo*.

#### **Промышленная применимость**

[0072] Настоящее изобретение может быть применено для лечения аутоиммунного заболевания.

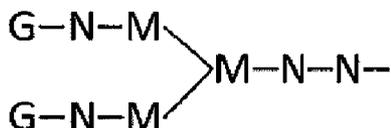
#### **Произвольный текст перечня последовательностей**

[0073] Последовательности № 1, 2: ферменты

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противовоспалительный препарат на основе афукозилированного иммуноглобулина, в котором содержащееся антитело класса IgG получено из сывороточного антитела класса IgG человека, в котором изображенный ниже гликан связан с аспарагином 297 (Asn297) области Fc (в данном случае G представляет собой галактозу, N представляет собой N-ацетилглюкозамин, а M представляет собой маннозу).

[Схема 1]



2. Противовоспалительный препарат на основе афукозилированного иммуноглобулина по п. 1, причем препарат применяют для профилактики и/или лечения аутоиммунного заболевания.

3. Противовоспалительный препарат на основе афукозилированного иммуноглобулина по п. 2, причем аутоиммунное заболевание представляет собой любое заболевание, выбранное из болезни Кавасаки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Гийена-Барре, хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, аутоиммунной нейтропении, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного приобретенного дефицита фактора VIII, рассеянного склероза, миастении гравис, синдрома ригидного человека, мультифокальной нейропатии, ANCA-ассоциированного васкулита, хронического ревматоидного артрита, системной красной волчанки, пемфигуса, буллезного пемфигоида, болезни Бехчета, язвенного колита, болезни Крона, синдрома Рейтера, полимиозита, дерматомиозита, ограниченной склеродермии, системной склеродермии, синдрома Шегрена, заболевания, ассоциированного с образованием антител к базальной мембране клубочков, первичного склерозирующего холангита, антифосфолипидного синдрома, токсического эпидермального некролиза, болезни «трансплантат против хозяина» и сепсиса.

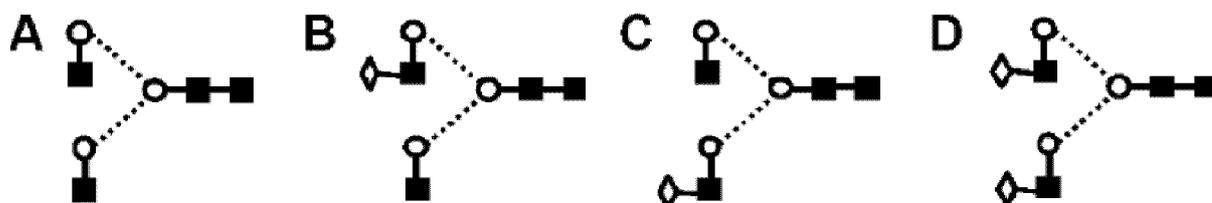
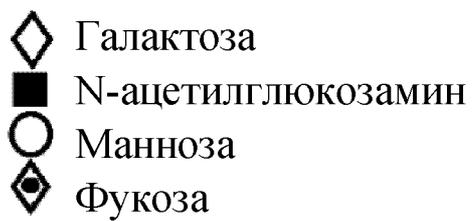
4. Способ получения противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина, включающий: стадию удаления гликанов с помощью эндогликозидазы S (Endo S) на сывороточном антителе класса IgG человека с целью расщепления на хитобиозном ядре гликана, связанного с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc, и удаления гликана, исключая N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком Asn297, и фукозу, связанную с N-ацетилглюкозамином;

стадию удаления фукозы с помощью  $\alpha$ -L-фукозидазы (AlfC) для удаления фукозы, связанной с N-ацетилглюкозамином; и

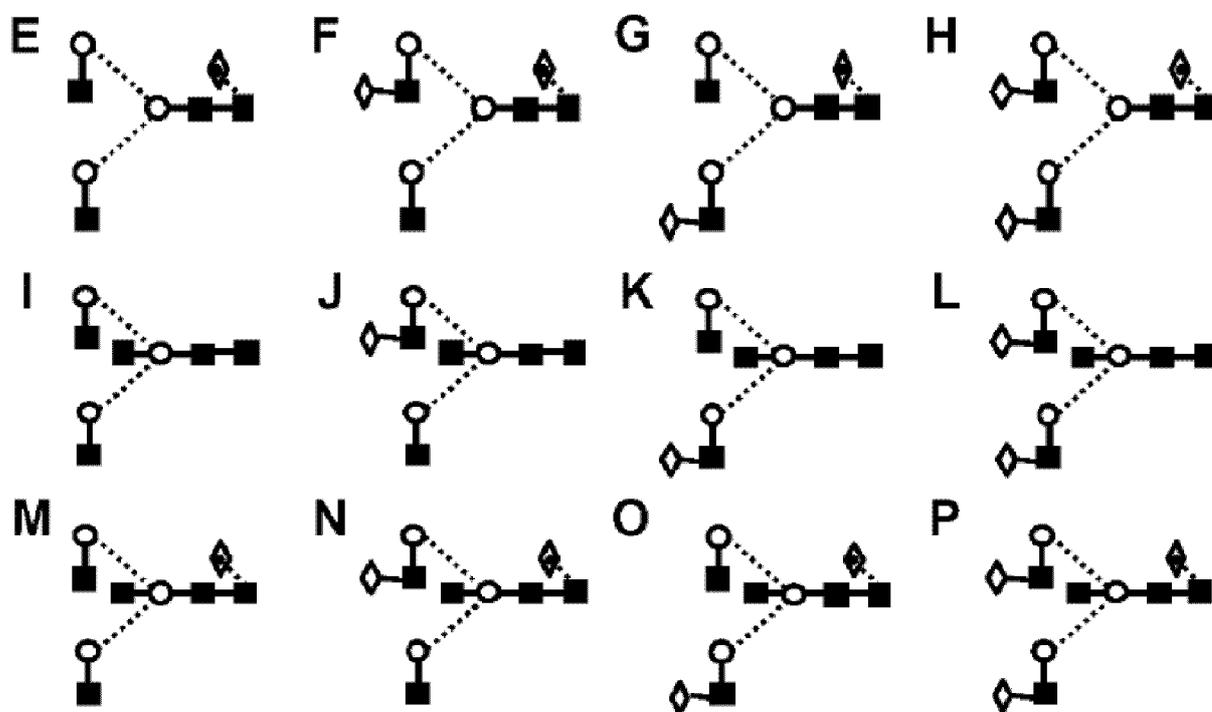
стадию переноса с помощью гликосинтазы (Endo S D233Q) оксазолированного гликана, полученного из галактозилгликопептид (GG-Ox), на N-ацетилглюкозамин, связанный с остатком аспарагина 297 (Asn297) области Fc сывороточного антитела класса IgG человека.

5. Способ получения противовоспалительного препарата на основе афукозилированного иммуноглобулина по п. 4, в котором на стадии удаления фукозы  $\alpha$ -L-фукозидаза представляет собой 1,6- $\alpha$ -L-фукозидазу.

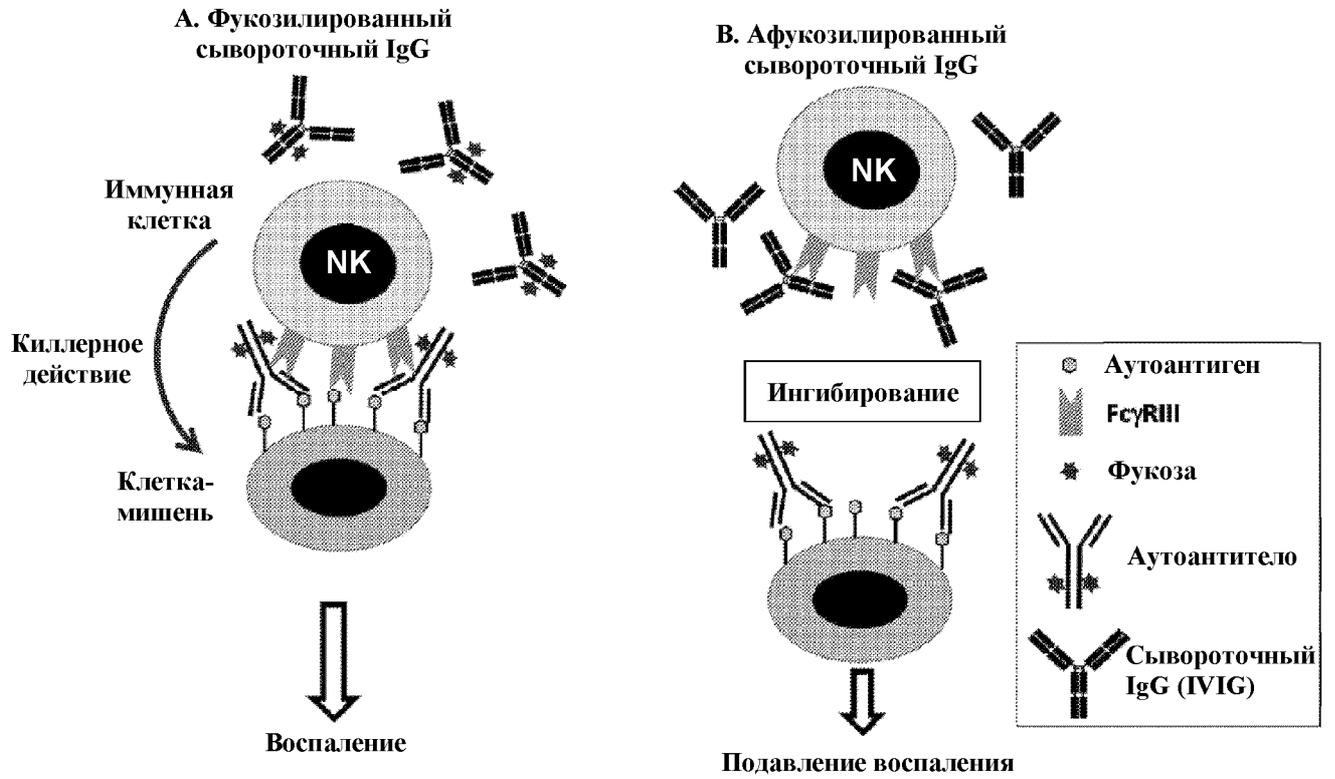
[Фиг. 1]



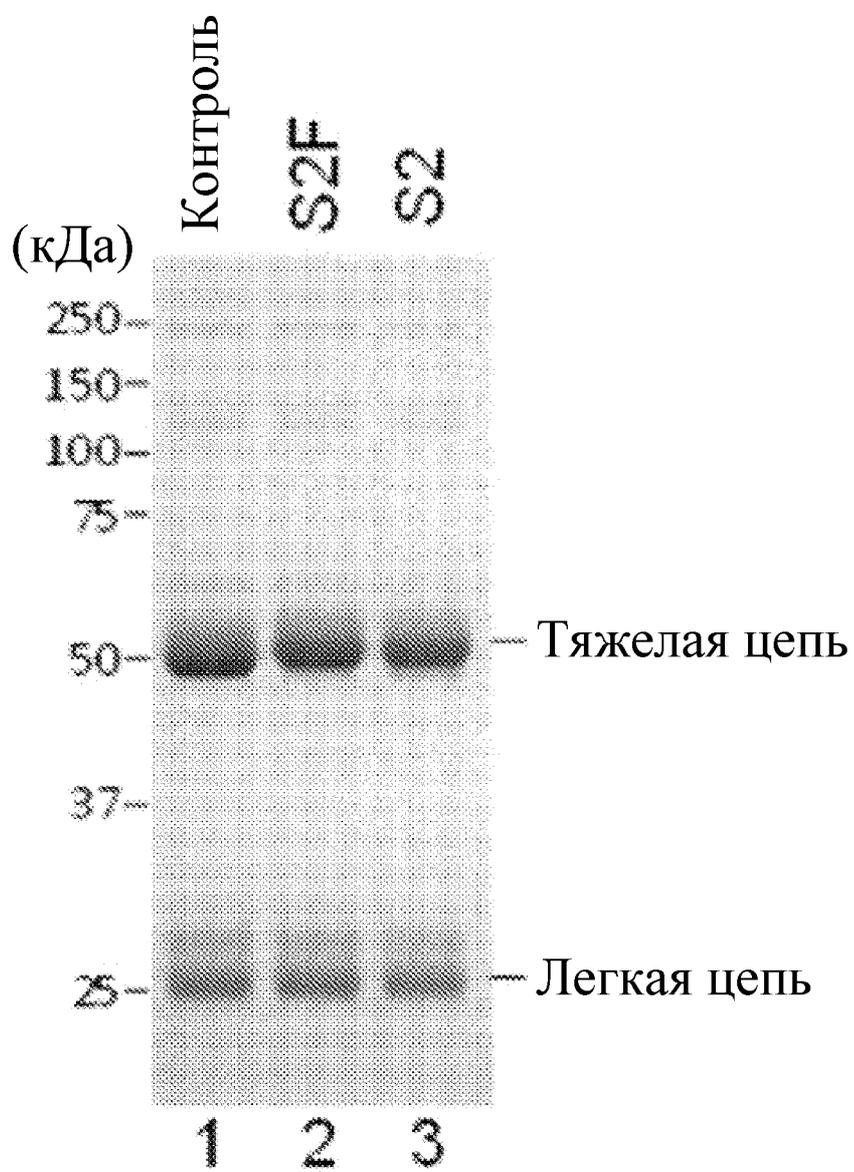
Структура ядра, состоящая из семи сахаров



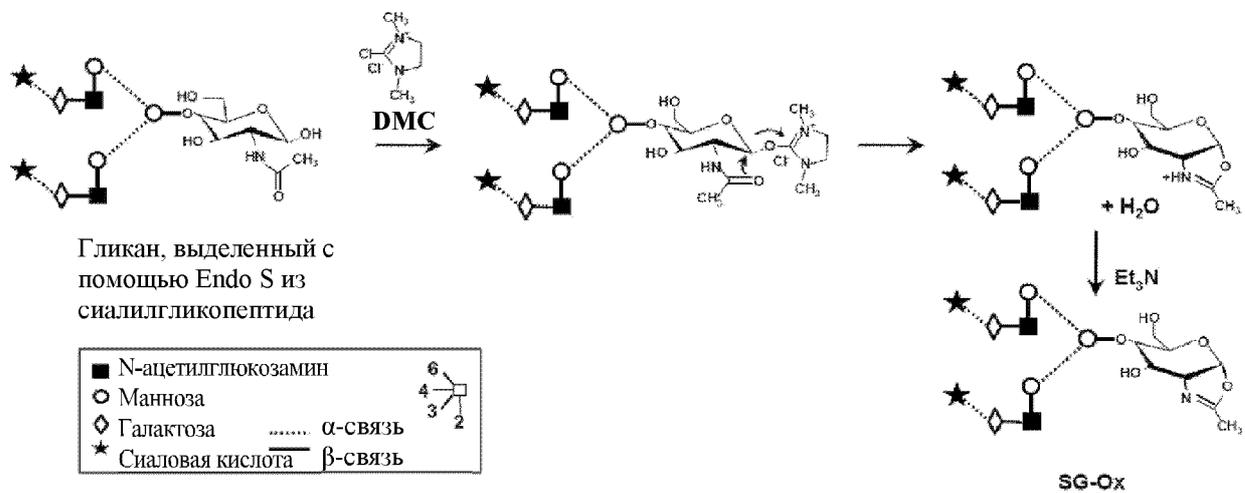
[Фиг. 2]



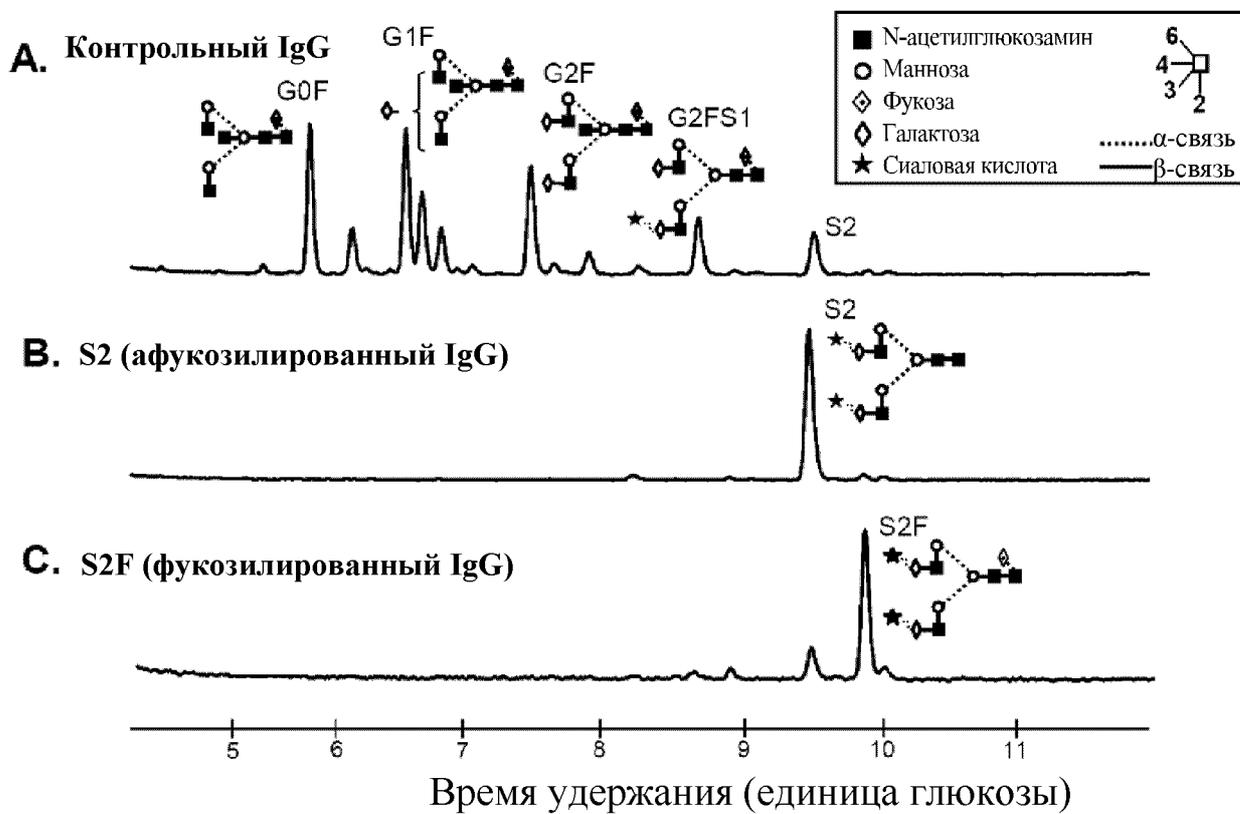
[Фиг. 3]



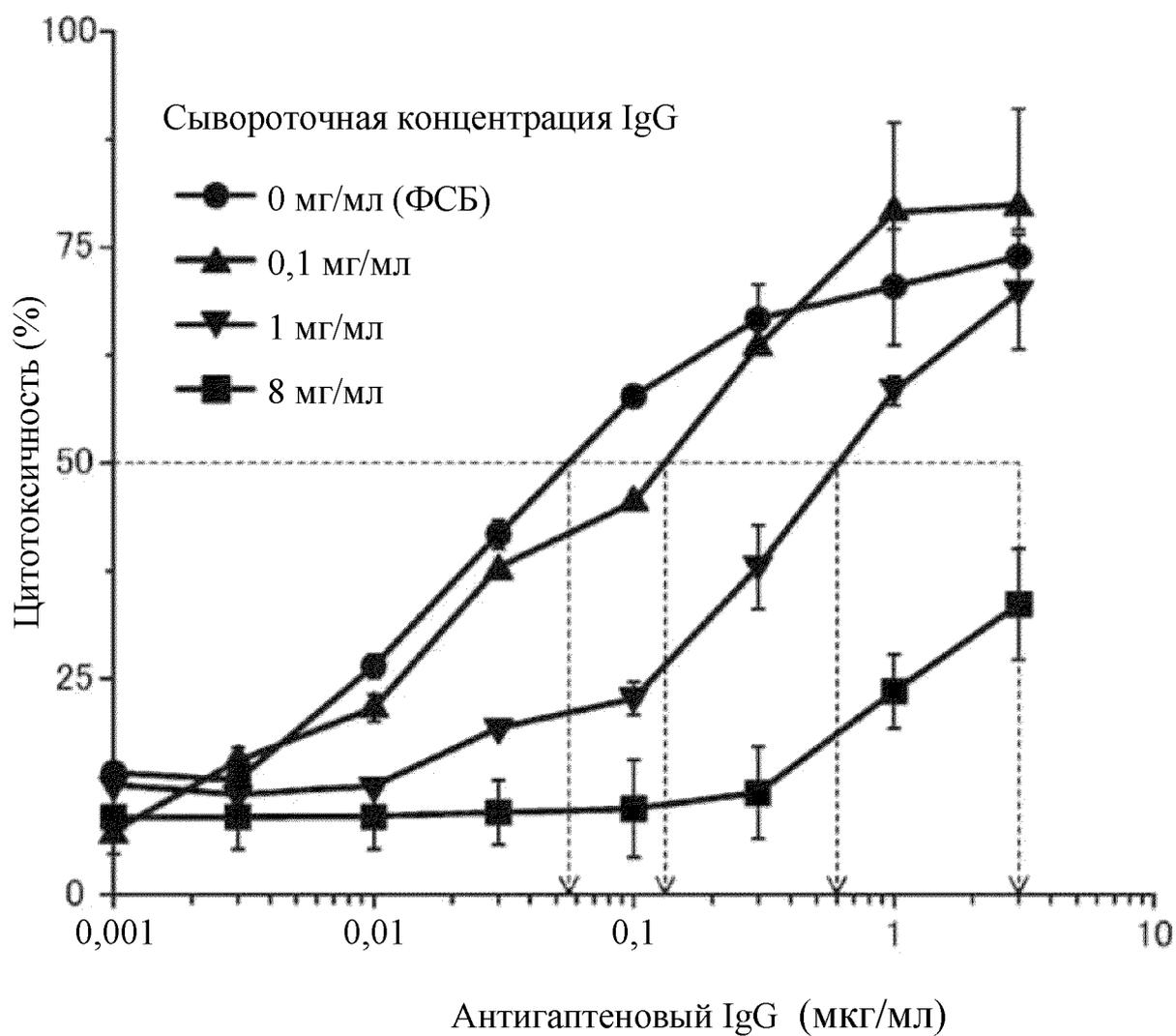
[Фиг. 4]



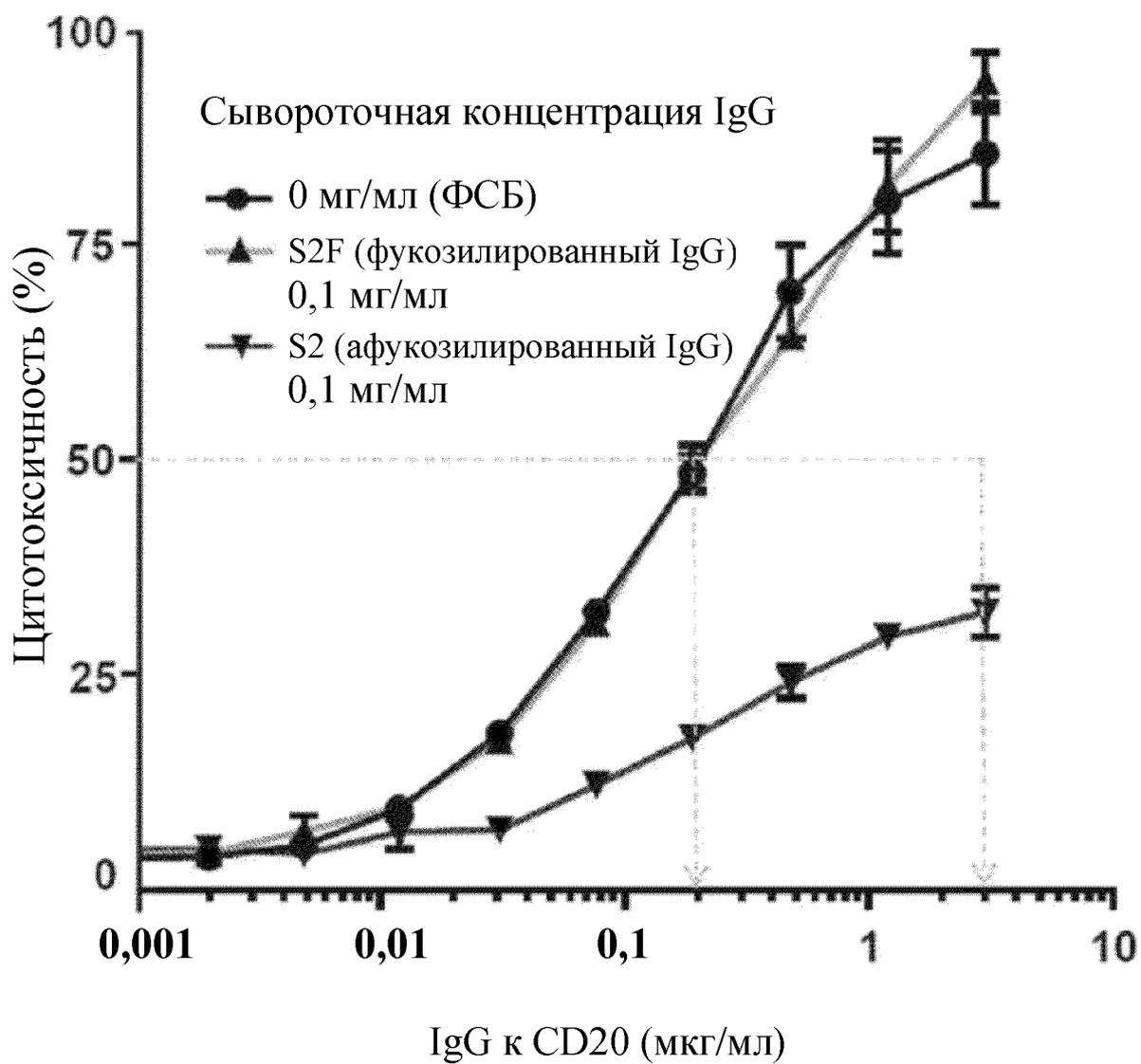
[Фиг. 5]



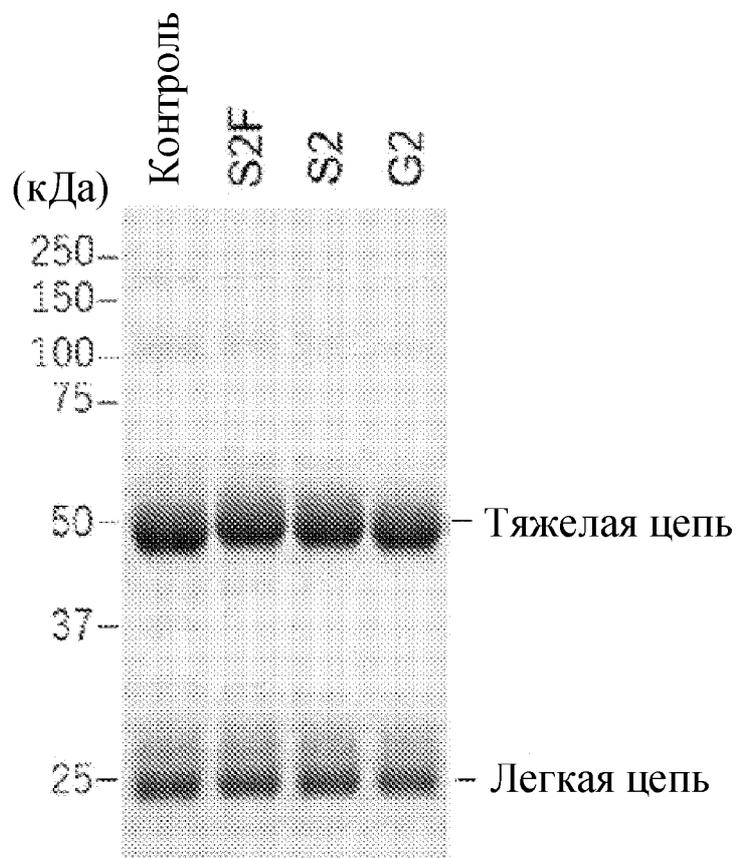
[Фиг. 6]



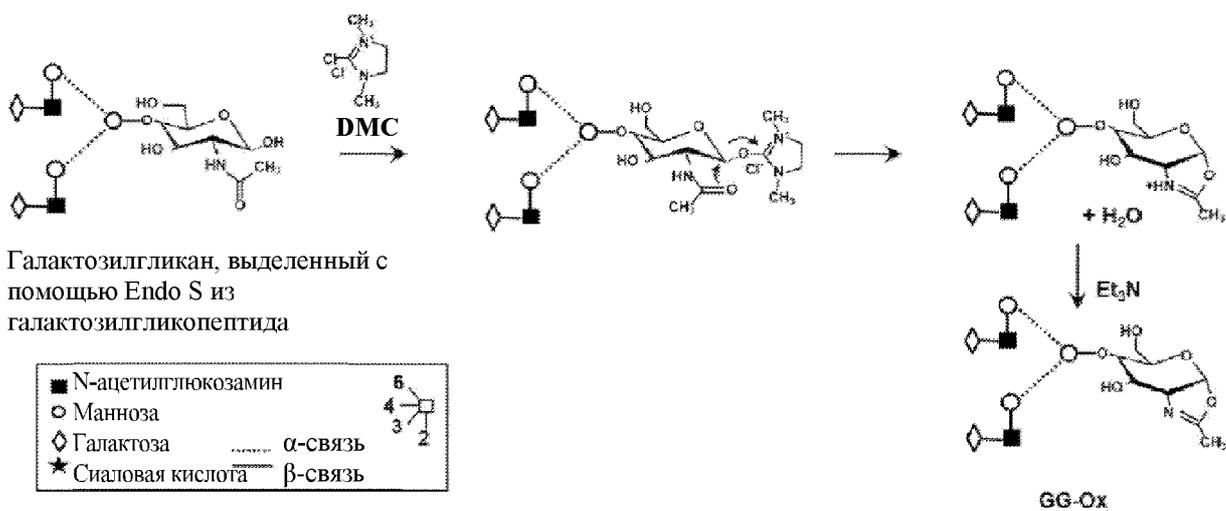
[Фиг. 7]



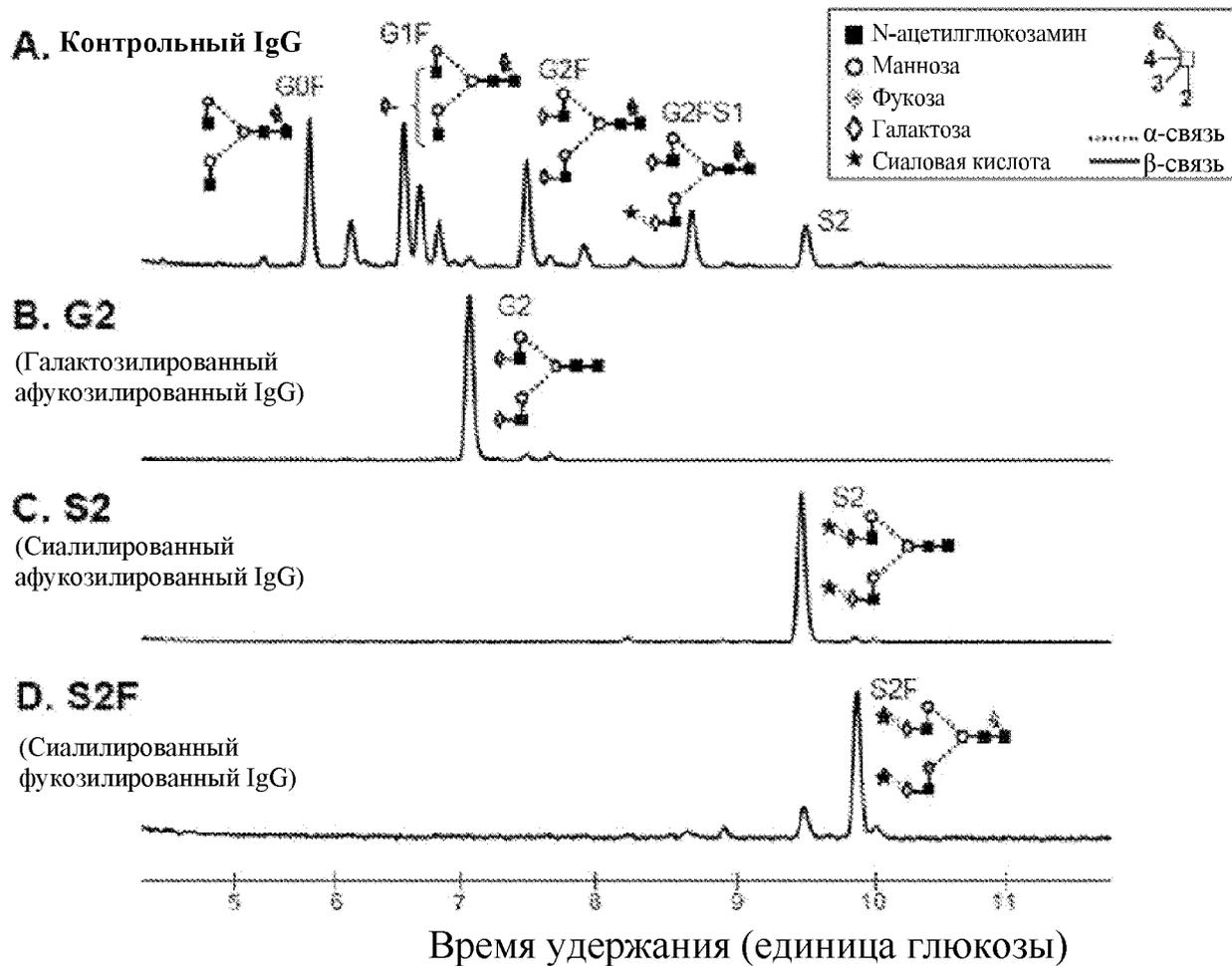
[Фиг. 8]



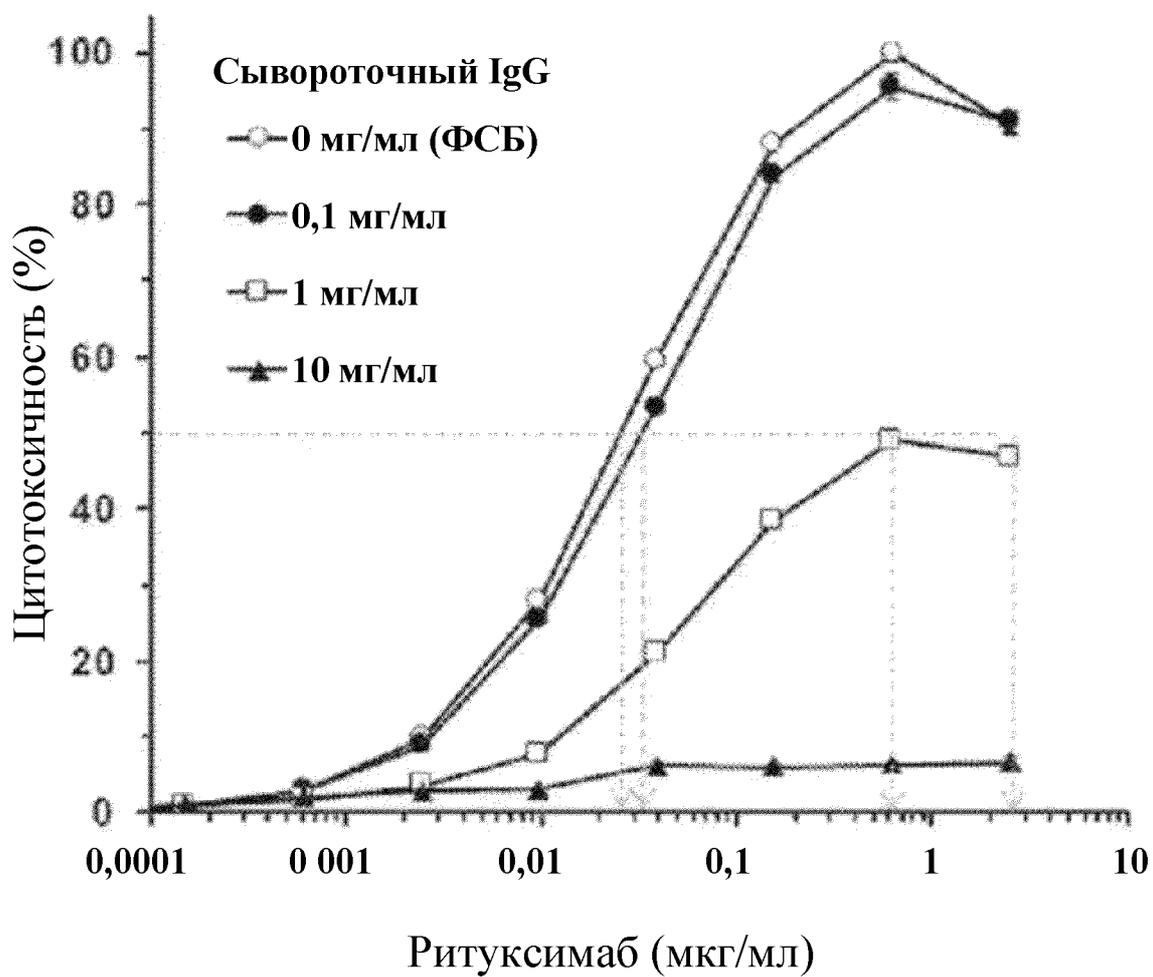
[Фиг. 9]



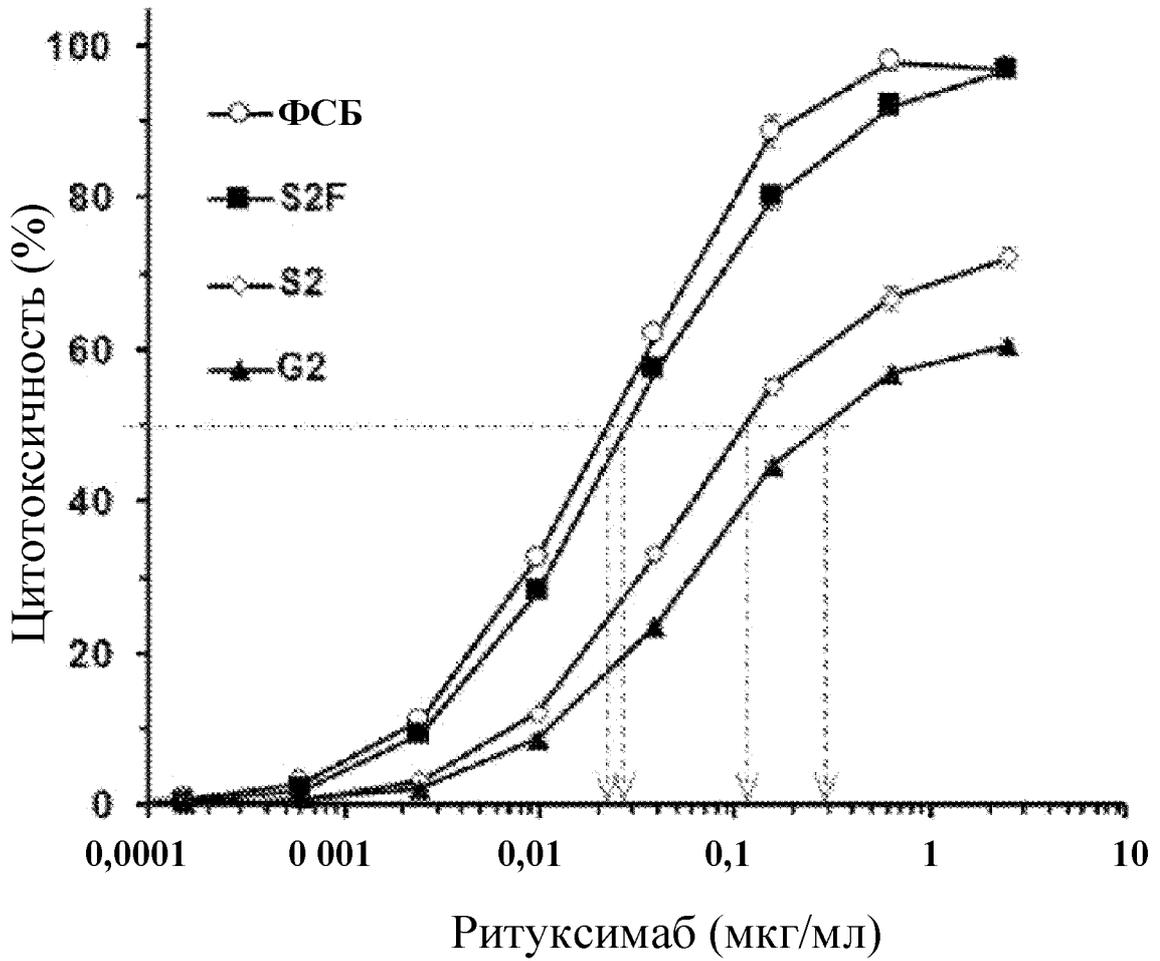
[Фиг. 10]



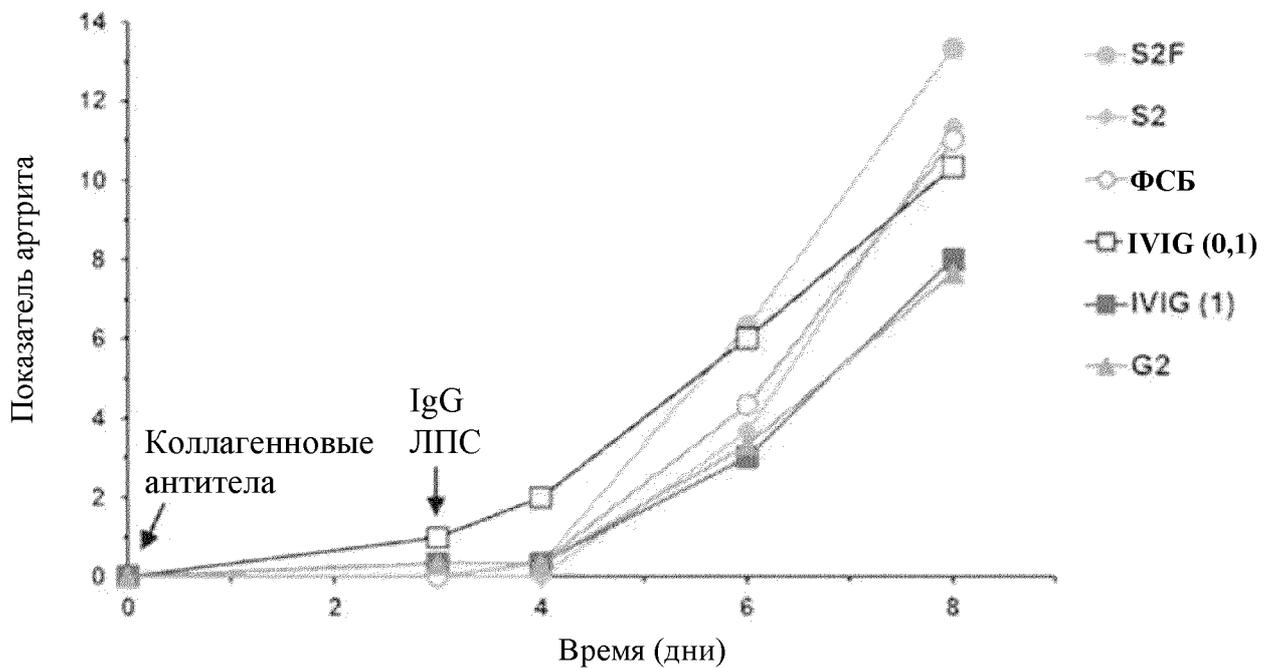
[Фиг. 11]



[Фиг. 12]

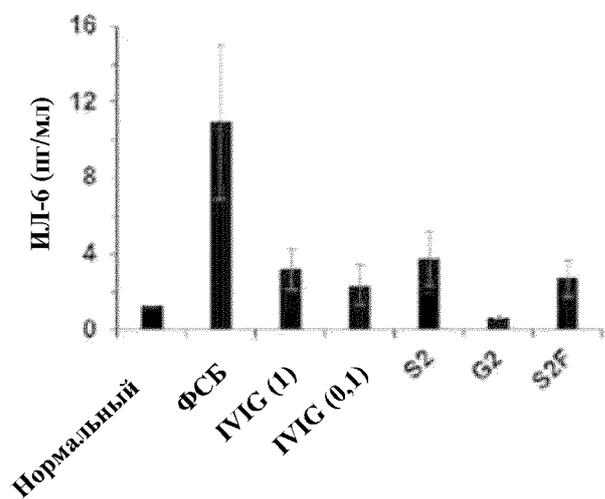


[Фиг. 13]



[Фиг. 14]

А. ИЛ-6



В. СРБ

