

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)

(21) Номер заявки
202090617

(22) Дата подачи заявки
2018.09.11

**(54) АНТИТЕЛО К ФНО-АЛЬФА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ,
СОДЕРЖАЩАЯ ЭТО АНТИТЕЛО, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, СПОСОБЫ ТРАНСЦИТОЗА И
УВЕЛИЧЕНИЯ ВРЕМЕНИ ПОЛУЖИЗНИ В ПЛАЗМЕ**

(31) **17191989.7**

(32) **2017.09.19**

(33) **EP**

(43) **2020.07.27**

(86) **PCT/EP2018/074522**

(87) **WO 2019/057564 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТИЛЛОТТС ФАРМА АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Фуррер Эстер Мария (CH), Андерсен
Ян Терье, Сандлье Ингер, Фосс Стиан
(NO)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) R. DENG ET AL.: "Pharmacokinetics of Humanized Monoclonal Anti-Tumor Necrosis Factor-Antibody and Its Neonatal Fc Receptor Variants in Mice and Cynomolgus Monkeys", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 38, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 600-605, XP055019071, ISSN: 0090-9556, DOI: 10.1124/dmd.109.031310, Abstract and introduction
YEUNG YIK ANDY ET AL.: "Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 182, no. 12, 1 June 2009 (2009-06-01),

pages 7663-7671, XP002566420, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.0804182, The whole document, in particular, Fig. 2A

TIMOTHY T. KUO ET AL.: "Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics", MABS, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 422-430, XP055079703, DOI: 10.4161/mabs.3.5.16983, The whole document, in particular, Fig. 1, p. 427, col. 1, para. 2 and Table 1

T. SUZUKI ET AL.: "Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 184, no. 4, 15 February 2010 (2010-02-15), pages 1968-1976, XP055064717, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.0903296, The whole document, in particular, p. 1970, col. 2, para 1

YASMINA NOUBIA ABDICHE ET AL.: "The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity", MABS, vol. 7, no. 2, 4 March 2015 (2015-03-04), pages 331-343, XP055331493, US, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2015.1008353, The whole document, in particular, Table 3

WARD E. SALLY ET AL.: "Targeting FcRn for the modulation of antibody dynamics", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 67, no. 2, 9 March 2015 (2015-03-09), pages 131-141, XP029246896, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2015.02.007, The whole document, in particular, section 5.2

Arvind Rajpal ET AL.: "Introduction: Antibody Structure and Function" In: "Therapeutic Fc-Fusion Proteins", 19 February 2014 (2014-02-19), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, XP055198075, ISBN: 978-3-52-733317-2, pages 1-44, DOI: 10.1002/9783527675272.ch01, the whole document

WO-A1-2017158426

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с ФНО- α и демонстрируют модифицированное связывание FcRn, к фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело. Также раскрыто применение антитела для лечения воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта, а также способ улучшения его трансцитоза и способ увеличения времени полужизни в плазме.

Область техники

Настоящее изобретение относится к модифицированным антителам с измененными эффекторными функциями и/или измененными фармакокинетическими свойствами. Указанные антитела подходят для терапевтического лечения различных расстройств (заболеваний), в частности, воспалительных состояний.

Уровень техники

Важность моноклональных антител как терапевтических реагентов в клинической медицине возросла на протяжении последних 20 лет. На протяжении многих лет усилия, направленные на усовершенствование антител, были сосредоточены на уменьшении их потенциальной иммуногенности, обуславливая получение гуманизированных или даже полностью человеческих антител. Другой подход нацелен на оптимизацию антител за счет улучшения их эффекторных функций. В то время как прямые эффекты опосредованы вариабельной антигенсвязывающей областью указанного антитела, не прямые эффекты опосредованы константной Fc-областью. Усилия, направленные на усовершенствование эффекторных функций, сосредоточены в основном на модуляции Fc-области. Кроме того, желательны увеличение времени полужизни в сыворотке терапевтических антител, что может снизить требуемое количество антител и повысить удобство применения для пациентов за счет удлинения терапевтических интервалов.

Иммуноглобулин G (IgG) представлял собой предпочтительный класс выбора в терапевтических применениях по нескольким причинам; IgG легко очистить, они относительно стабильны при хранении, могут вводиться внутривенно, обладают продолжительным биологическим временем полужизни *in vivo* и способны стимулировать ряд биологических эффекторных функций, таких как активация комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) и рекрутинг эффекторных клеток, за счет различных взаимодействий Fc с рецепторами (антителозависимая клеточная цитотоксичность; АЗКЦ). IgG демонстрирует самое продолжительное из иммуноглобулинов пяти классов биологическое время полужизни за счет уникального взаимодействия с рецептором рециклинга IgG, неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Одна из известных функций указанного рецептора заключается в предотвращении каталитического разложения IgG. На основании расшифрованной сокристаллической структуры FcRn-Fc установлено, что взаимодействие с Fc происходит в области IgG шарнир-C_H2-C_H3. Указанное взаимодействие происходит строго pH-зависимым образом при кислотных значениях pH 6,0-6,5 в эндосомах. Связанные молекулы IgG повторно поступают на поверхность клеток, где они высвобождаются в кровотоки при физиологическом значении pH 7,4, тогда как не связанные в комплексах молекулы IgG обречены на разложение лизосомами. Указанный рециклинг представляет собой механизм, обеспечивающий продолжительное время полужизни IgG; модуляция взаимодействия FcRn-IgG, соответственно, обеспечивает специфический контроль времени полужизни в сыворотке иммуноглобулинов гамма и слитых с Fc белков.

В зависимости от применения может быть желательно увеличение или уменьшение времени удержания IgG в сыворотке. Для терапевтического применения желательно более продолжительное время полужизни, поскольку это позволяет использовать меньшие дозы и меньшее число инъекций. Было исследовано несколько способов увеличения времени полужизни, в том числе применение полиэтиленгликоля (ПЭГ), получение слитых с альбумином или Fc белков, а также усиление взаимодействия FcRn с IgG. Пегилированные фармацевтические средства используют в клинике с 1990 года; пегилирование представляет собой хорошо известную технологию увеличения продолжительности удержания лекарственного средства в крови. Поскольку FcRn также обеспечивает рециклинг сывороточного альбумина человека (ЧСА) за счет pH-зависимого взаимодействия, было также получено несколько слитых с альбумином белков для увеличения стабильности и времени полужизни. Кроме того, фрагменты антител, слитые с альбумином или альбумин-связывающими доменами, демонстрировали продленное время удержания в сыворотке в доклинических исследованиях. Получение слитых с Fc белков представляет собой другую стратегию обеспечения свойств белков или пептидов, аналогичных свойствам интактного антитела.

Исследованные модификации Fc-области собраны в источнике: Saxena (2016) *Frontiers in Immunology*, Vol. 7, Article 580.

Сохраняется потребность в антителах с улучшенными эффекторными функциями и/или фармакокинетикой.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые конкретные мутации в Fc-области антитела значительно улучшают аффинность антитела в отношении FcRn при pH 6, тогда как аффинность при pH 7,4 остается незначительной. Предположительно, антитела с указанными мутациями будут обладать улучшенными фармакокинетическими свойствами. Кроме того, указанные антитела демонстрируют эффекторные функции, превосходящие эффекторные функции известных антител, таких как инфликсимаб (IFX).

Настоящее изобретение, соответственно, относится к объекту изобретения, определенному следующими пунктами [1]-[88].

[1] Антитело, содержащее связывающий FНО- α домен и сайт связывания FcRn, обладающее высокой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 6, причем указанная высокая аффинность характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D) менее 100 нМ, и дополнительно обладающее низкой

аффинностью в отношении FcRn человека при pH 7,4, причем указанная низкая аффинность характеризуется K_D , превышающей 1 мкМ, и отличающееся тем, что последовательность аминокислот указанного антитела содержит аминокислоту 434W.

[2] Антитело по п.[1], характеризующееся тем, что последовательность аминокислот указанного антитела дополнительно содержит аминокислоту 428E и/или аминокислоту 311R.

[3] Антитело по п.[1] или [2], характеризующееся тем, что последовательность аминокислот указанного антитела содержит аминокислоты 311R, 428E и 434W.

[4] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело получают путем замены триптофаном аспарагина в положении 434 (N434W), необязательно, замены глутаминовой кислотой метионина в положении 428 (M428E), и необязательно, замены аргинином глутамина в положении 311 (Q311R).

[5] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело получают путем замены глутаминовой кислотой метионина в положении 428 (M428E).

[6] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело получают путем замены аргинином глутамина в положении 311 (Q311R).

[7] Антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее тяжелую цепь, которая содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:13.

[8] Антитело по любому из предшествующих пунктов, обладающее в отношении FcRn человека при pH 6 аффинностью, большей, чем аффинность инфликсимаба.

[9] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что высокая аффинность в отношении FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D менее 50 нМ.

[10] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанная высокая аффинность в отношении FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D менее 25 нМ.

[11] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанная высокая аффинность в отношении FcRn человека при pH 6 характеризуется константой диссоциации K_D менее 10 нМ.

[12] Антитело по любому из предшествующих пунктов, обладающее аффинностью в отношении FcRn человека при pH 6, характеризующейся константой диссоциации K_D в диапазоне от 1 нМ до 500 нМ, или от 2 нМ до 100 нМ, или от 3 нМ до 50 нМ, или от 4 нМ до 25 нМ, или от 5 нМ до 10 нМ.

[13] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанную высокую аффинность или K_D , характеризующую указанную высокую аффинность, определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[14] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанная низкая аффинность в отношении FcRn человека при pH 7,4 характеризуется K_D , превышающей 10 мкМ.

[15] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что K_D , характеризующую указанную аффинность в отношении FcRn человека при pH 7,4, определяют с применением ППР.

[16] Антитело по любому из пп.[1]-[15], характеризующееся тем, что аффинность в отношении FcRn человека при pH 7,4 является настолько низкой, что значение K_D не может быть определено с применением ППР.

[17] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α человека с K_D менее 200 пМ.

[18] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α человека с K_D менее 100 пМ.

[19] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α человека с K_D менее 50 пМ.

[20] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α человека с K_D менее 25 пМ.

[21] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α человека с K_D менее 10 пМ.

[22] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое транспортируется через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне.

[23] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое транспортируется через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в большем количестве, чем контрольное антитело, содержащее легкую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO:1, и тяжелую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO:2.

[24] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое транспортируется через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в большем количестве, чем инфликсимаб.

[25] Антитело по п.[24], характеризующееся тем, что количество антитела, транспортируемого че-

рез монослой поляризованных клеток, более чем в два раза превышает количество инфликсимаба, транспортируемое через монослой поляризованных клеток.

[26] Антитело по любому из пп.[23]-[25], характеризующееся тем, что указанное количество относится к массе антитела, транспортируемого через монослой поляризованных клеток в пределах четырех часов.

[27] Антитело по любому из пп.[22]-[26], характеризующееся тем, что количество антитела, транспортируемого через монослой поляризованных клеток, более чем в два раза превышает количество исходного иммуноглобулина, транспортируемого через монослой поляризованных клеток, причем указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что его Fc-область содержит только аминокислоты дикого типа.

[28] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в присутствии десятикратного избытка конкурирующих иммуноглобулинов транспортируется более высокий процент указанного антитела, чем процент инфликсимаба, причем процент относится к общей массе иммуноглобулинов, транспортируемых через монослой поляризованных клеток.

[29] Антитело по п.[28], характеризующееся тем, что процент указанного антитела, транспортируемый через монослой поляризованных клеток, более чем в три раза превышает процент исходного иммуноглобулина, транспортируемого через монослой поляризованных клеток, причем указанный исходный иммуноглобулин отличается от указанного антитела только тем, что его Fc-область содержит только аминокислоты дикого типа.

[30] Антитело по п.[28] или [29], характеризующееся тем, что процент указанного антитела, транспортируемый через монослой поляризованных клеток, более чем в три раза выше процента инфликсимаба, транспортируемого через монослой поляризованных клеток.

[31] Антитело по любому из пп.[22]-[30], характеризующееся тем, что указанный монослой поляризованных клеток представляет собой монослой поляризованных клеток T84.

[32] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD64 с K_D менее 100 нМ, предпочтительно менее 10 нМ.

[33] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD32a(H) с K_D менее 10 мкМ.

[34] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD32a(R) с K_D менее 10 мкМ.

[35] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD32b с K_D менее 10 мкМ.

[36] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD16a(V) с K_D менее 500 нМ, предпочтительно менее 100 нМ.

[37] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD16a(F) с K_D менее 10 мкМ, предпочтительно менее 1 мкМ.

[38] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с CD16b(NA2) с K_D менее 10 мкМ, предпочтительно менее 1 мкМ.

[39] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с C1q человека с большей силой, чем инфликсимаб.

[40] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся более высокой комплементзависимой цитотоксичностью в отношении комплемента кролика, чем инфликсимаб, в терминах относительной EC_{50} и/или относительной максимальной гибели.

[41] Антитело по любому из предшествующих пунктов, способное индуцировать CD14+CD206+ макрофаги на уровне, равном индуцируемому инфликсимабом, или более высоким.

[42] Антитело по любому из предшествующих пунктов, способное подавлять пролиферацию T-клеток в степени, равной обеспечиваемой инфликсимабом, или в большей степени.

[43] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой нефукозилированное антитело или антитело, характеризующееся пониженным фукозилированием.

[44] Антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее (i) домен V_L , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 3, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 4, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 5; и (ii) домен V_H , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 6, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

[45] Антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее домен V_H с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9, и домен V_L с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 10.

[46] Антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее легкую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 11.

[47] Антитело по любому из пп.[1]-[43], характеризующееся тем, что указанное антитело содержит

(i) домен V_L , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 14, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 15, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 16; и (ii) домен V_H , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 17, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 18, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 19.

[48] Антитело по п.[47], содержащее домен V_H с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 20, и домен V_L с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22.

[49] Антитело по п.[47] или [48], содержащее легкую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 12.

[50] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело специфически связывается с ФНО- α человека.

[51] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело значимо не связывается с ФНО- β .

[52] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело:

(i) связывается с ФНО- α человека с константой диссоциации (K_D) менее 125 пМ;

(ii) способно к перекрестным реакциям с ФНО- α *Masaca mulatto*, и ФНО- α *Masaca fascicularis*,

(iii) отличается более высокой активностью (potency), чем инфликсимаб, по оценке с применением анализа L929; и/или

(iv) способно к связыванию с ФНО- $\alpha_{\text{Тример}}$ человека со стехиометрическим соотношением (антитело:ФНО- $\alpha_{\text{Тример}}$), равным по меньшей мере 2.

[53] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α *Masaca mulatta* с K_D менее 1 нМ.

[54] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α *Masaca fascicularis* с K_D менее 1 нМ.

[55] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что активность ингибирования указанным антителом ФНО- α -индуцированного апоптоза относительно активности инфликсимаба (относительная активность), определенная в анализе L929, превышает 3,5, где указанная относительная активность представляет собой соотношение значения IC_{50} в нг/мл инфликсимаба в анализе L929 и значения IC_{50} в нг/мл указанного антитела в анализе L929.

[56] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что температура плавления вариабельного домена указанного антитела в формате scFv, определенная путем дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 65°C.

[57] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что температура плавления вариабельного домена указанного антитела в формате scFv, определенная путем дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 68°C.

[58] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что температура плавления, определенная путем дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 70°C.

[59] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело способно блокировать взаимодействие между ФНО- α человека и рецептором ФНО I (TNFR1).

[60] Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело способно блокировать взаимодействие между ФНО- α человека и рецептором ФНО II (TNFR2).

[61] Антитело по любому из предшествующих пунктов, способное ингибировать пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови в реакции смешанной культуры лимфоцитов.

[62] Антитело по любому из предшествующих пунктов, способное ингибировать ЛПС-индуцированную секрецию интерлейкина-1 β моноцитами CD14⁺.

[63] Антитело по п.[62], характеризующееся тем, что значение IC_{50} для ингибирования ЛПС-индуцированной секреции интерлейкина-1 β меньше 1 нМ.

[64] Антитело по п.[63], характеризующееся тем, что значение IC_{50} для ингибирования ЛПС-индуцированной секреции интерлейкина-1 β , в расчете на моли, меньше соответствующего значения IC_{50} адалимумаба.

[65] Антитело по любому из предшествующих пунктов, способное ингибировать ЛПС-индуцированную секрецию ФНО- α моноцитами CD14⁺.

[66] Антитело по п.[65], характеризующееся тем, что значение IC_{50} для ингибирования ЛПС-индуцированной секреции ФНО- α меньше 1 нМ.

[67] Антитело по п.[66], характеризующееся тем, что значение IC_{50} для ингибирования ЛПС-

индуцированной секреции ФНО- α , в расчете на моли, меньше соответствующего значения IC_{50} адалиму-маба.

[68] Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой иммуноглобулин G (IgG), предпочтительно, IgG1.

[69] Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предшествующих пунктов.

[70] Вектор или плазида, содержащий (содержащая) нуклеиновую кислоту по п.[69].

[71] Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.[69], или вектор или плазмиду по п.[70].

[72] Способ получения антитела по любому из пп.[1]-[68], включающий культивирование клетки по п.[71] в среде в условиях, позволяющих провести экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное антитело, и выделение указанного антитела из клеток или из среды.

[73] Антитело по любому из пп.[1]-[68] для применения в лечении воспалительного состояния или связанного с ФНО- α расстройства.

[74] Антитело для применения в соответствии с пунктом [73], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство выбирают из перечня заболеваний и расстройств, перечисленных в разделе "Расстройства, подлежащие лечению" ниже.

[75] Антитело для применения в соответствии с пунктом [73], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство представляет собой воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта.

[76] Антитело для применения в соответствии с пунктом [75], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

[77] Антитело для применения в соответствии с пунктом [75] или [76], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой болезнь Крона.

[78] Антитело для применения в соответствии с пунктом [77], характеризующееся тем, что болезнь Крона выбрана из группы, состоящей из болезни Крона подвздошной кишки, ободочной кишки, тонкого и толстого кишечника, и/или изолированной болезни Крона верхних отделов ЖКТ (желудка, двенадцатиперстной кишки и/или тощей кишки), и включающей заболевание без образования стриктур/непроникающее заболевание, заболевание с образованием стриктур, проникающее заболевание и перианальное заболевание, с допущением любой комбинации локализации и любых из вышеупомянутых вариантов поведения заболевания.

[79] Антитело для применения в соответствии с пунктом [75] или [76], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой язвенный колит.

[80] Антитело для применения в соответствии с пунктом [79], характеризующееся тем, что указанный язвенный колит выбран из группы, состоящей из язвенного проктита, проктосигмоидита, левостороннего колита, язвенного панколита и воспаления илеоанального кармана.

[81] Антитело для применения в соответствии с пунктом [75] или [76], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой микроскопический колит.

[82] Антитело для применения в соответствии с пунктом [73], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство представляет собой артрит.

[83] Антитело для применения в соответствии с пунктом [73] или [82], характеризующееся тем, что указанное воспалительное расстройство представляет собой ревматоидный артрит.

[84] Антитело для применения в соответствии с любым из пп.[73]-[83], характеризующееся тем, что описанный способ включает перорально введение указанного антитела субъекту.

[85] Антитело для применения в соответствии с любым из пп.[73]-[84], характеризующееся тем, что описанный способ включает местное применение указанного антитела.

[86] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.[1]-[68].

[87] Способ улучшения трансцитоза антитела, направленного против ФНО- α , включающий введение замен Q311R, M428E и N434W в последовательность аминокислот указанного антитела.

[88] Способ увеличения времени полужизни в плазме антитела, направленного против ФНО- α , включающий введение замен Q311R, M428E и N434W в последовательность аминокислот указанного антитела.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - активность вариантов антител против ФНО- α для нейтрализации ФНО- α человека в анализе L929. Приведены кривые зависимости "доза-ответ" для вариантов антител против ФНО- α и референсного инфликсимаба.

Фиг. 2 - транспорт вариантов IgG против ФНО- α через поляризованные клетки T84. Приведены количества вариантов антител против ФНО- α и инфликсимаба (IFX) в направлении от апикального к базолатеральному резервуару через 4 часа после добавления. Значения приведены в ng/cm^2 . Планками по-

грешностей обозначено SD для 2-4 индивидуальных монослоев.

Фиг. 3 - транспорт вариантов IgG против ФНО- α через поляризованные клетки T84 в присутствии избыточных количеств белка IgG-миеломы. Приведены количества вариантов Ab против ФНО- α и IFX, транспортируемые в направлении от апикального к базолатеральному резервуару в присутствии 10-кратного избытка белка IgG-миеломы человека через 4 часа после добавления. Значения приведены в нг/см². Планками погрешностей обозначено SD для 3-4 индивидуальных монослоев.

Фиг. 4 - АЗКЦ-активность. Индукция АЗКЦ вариантами антител против ФНО- α , антителом дикого типа и IFX.

Фиг. 5 - связывание с C1q человека. Связывание IFX и вариантов антител против ФНО- α с C1q человека. Каждую концентрацию анализировали в двух повторностях. Планками погрешностей обозначено SD.

Фиг. 6 - КЗЦ-активность. Сравнение процента гибели клеток при применении различных вариантов против ФНО- α и при применении IFX. Каждая точка измерения представляет собой среднее значение для 6 независимых репликатов.

Фиг. 7 - сравнение индукции макрофагов CD14⁺CD206⁺ каждым соединением и индукции IFX. Обобщенные данные для 4 независимых экспериментов. Столбцами обозначены средние значения, планками погрешностей обозначена SEM.

Фиг. 8 - сравнение подавления пролиферации Т-клеток каждым соединением и подавления IFX. Обобщенные данные для 3 независимых экспериментов. Столбцами обозначены средние значения, планками погрешностей обозначена SEM.

Фиг. 9 - схематическое изображение сайт-направленного мутагенеза.

Фиг. 10 - схематическое изображение преобладающих форм N-гликанов, присоединенных к N297, из вариантов антител против ФНО- α . Два преобладающих профиля N-гликанов в панели протестированных вариантов антител против ФНО- α были представлены 4GlcNac-1Fuc-3Man и 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal, тогда как во вариантах IgG, продуцированных в присутствии 2FF, возникали такие же биантеннарные структуры, за исключением того, что в них отсутствовала фукоза.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу, способному к связыванию с ФНО- α и содержащему сайт связывания FcRn. В соответствии с настоящим изобретением антитело содержит сайт связывания FcRn, если оно способно к связыванию с FcRn, предпочтительно с FcRn человека, при pH 6. Связывание с FcRn при pH 6 может быть определено с применением ППП, например, согласно описанию в примере 4 в настоящем документе. В том случае, если связывание антитела с FcRn при pH 6 может быть детектировано с применением ППП, такое антитело содержит сайт связывания FcRn. Антитело согласно настоящему изобретению обладает высокой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 6, характеризующейся равновесной константой диссоциации (K_D) менее 100 нМ. Указанное антитело дополнительно обладает низкой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 7,4, характеризующейся K_D , превышающей 1 мкМ. Последовательность аминокислот указанного антитела содержит аминокислоту триптофан в положении 434 (нумерация EU).

В тексте настоящего описания и формулы изобретения систему нумерации Kabat обычно используют для указания остатка в переменном домене (приблизительно, остатков 1-107 легкой цепи и остатков 1-113 тяжелой цепи) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Систему нумерации EU" или "индекс EU" обычно используют для указания остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU согласно описанию в источнике: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), явным образом включенном в настоящий документ посредством ссылки). Если в настоящем документе не указано иное, указания номеров остатков в переменном домене антител соответствуют нумерации остатков в системе нумерации Kabat. Если в настоящем документе не указано иное, ссылки на номера остатков в константном домене антител соответствуют нумерации остатков в системе нумерации Европейского союза EU (см., например, WO 2006/073941).

Антитело.

В контексте настоящего документа термин "антитело" применяют в качестве синонима "иммуноглобулина" (Ig), который определен как белок, принадлежащий к классу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD (или любому их подклассу), и включает все стандартные известные антитела и их функциональные фрагменты. В контексте настоящего изобретения "функциональный фрагмент" антитела/иммуноглобулина определен как антигенсвязывающий фрагмент или другое производное исходного антитела, который по существу сохраняет одно или более из свойств такого исходного антитела. "Антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающий домен" антитела/иммуноглобулина определен как фрагмент (например, переменная область IgG), сохраняющий антигенсвязывающую область. "Антигенсвязывающая область" антитела, как правило, обнаруживается в одном или более гиперпеременных участках антитела, т.е. в участках CDR-1, CDR-2 и/или CDR-3. Антитела согласно настоящему изобретению может входить

в состав бифункциональных или многофункциональных конструкций.

Предпочтительно, указанное антитело представляет собой моноклональное антитело. Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе не ограничен антителами, продуцируемыми с использованием гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, происходящему из единственного клона, в том числе любого эукариотического, прокариотического или фагового клона, а не к способу, которым оно было получено. Моноклональные антитела могут быть получены с применением широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомной технологии, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея, или их комбинации. (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.).

Согласно другим вариантам реализации, в том числе вариантам реализации, связанным с применением *in vivo* антител против ФНО- α у человека, могут применяться химерные, приматизированные, гуманизированные антитела или антитела человека. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное антитело представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело, более предпочтительно - моноклональное антитело человека или моноклональное гуманизированное антитело.

Согласно другому конкретному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой иммуноглобулин, предпочтительно, иммуноглобулин G (IgG). Подкласс IgG согласно настоящему изобретению не ограничен и включает IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Предпочтительно, IgG согласно настоящему изобретению принадлежит к подклассу 1, 2 или 4, т.е. представляет собой молекулу IgG₁, IgG₂ или IgG₄, соответственно. Наиболее предпочтительно, IgG согласно настоящему изобретению принадлежит к подклассу 1, т.е. представляет собой молекулу IgG₁.

Связывающий ФНО- α домен.

Связывающий ФНО- α домен антитела согласно настоящему изобретению не ограничен каким-либо конкретным образом. Он может происходить из любого антитела, способного к связыванию с ФНО- α .

Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению специфически связывается с ФНО- α . Согласно настоящему документу антитело "специфически распознает" или "специфически связывается с" ФНО- α человека, если указанное антитело способно различать ФНО- α человека и одну или более референсных молекул. Предпочтительно, значение IC₅₀ для связывания с каждой из референсных молекул по меньшей мере в 1000 раз выше значения IC₅₀ для связывания с ФНО- α . В наиболее общей форме (и в отсутствие заданных референсных характеристик) "специфическое связывание" относится к способности указанного антитела различать ФНО- α человека и неродственную биомолекулу, определяемой, например, в соответствии со способами анализа специфичности, известными в данной области техники. Такие способы включают, не ограничиваясь перечисленными, вестерн-блоттинг и тестирование методом ИФА ELISA. Например, может быть проведен стандартный анализ ELISA. Как правило, определение специфичности связывания осуществляют с применением не одной референсной биомолекулы, а набора из приблизительно трех - пяти неродственных биомолекул, например, молочного порошка, БСА, трансферрина ил и т.п. Согласно одному варианту реализации специфическое связывание относится к способности указанного антитела различать ФНО- α человека и ФНО- β человека.

Антитело согласно настоящему изобретению включает домен V_L и домен V_H. Домен V_L содержит участок CDR1 (CDRL1), участок CDR2 (CDRL2), участок CDR3 (CDRL3) и каркасные области. Домен V_H содержит участок CDR1 (CDRH1), участок CDR2 (CDRH2), участок CDR3 (CDRH3) и каркасные участки.

Термин "CDR" относится к одной из шести гипервариабельных участков в пределах вариабельных доменов антитела, вносящих основной вклад в связывание антигена. Одно из чаще всего используемых определений шести CDR было представлено в источнике: Kabat E. A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242). В настоящем документе определение CDR по Kabat используется только для CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи (CDR L1, CDR L2, CDR L3; или L1, L2, L3), а также для CDR2 и CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи (CDR H2, CDR H3; или H2, H3). При этом CDR1 вариабельного домена тяжелой цепи (CDR H1 или H1) в настоящем документе определен как следующие остатки (нумерация по Kabat): он начинается с остатка в положении 26 и заканчивается перед положением 36.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело против ФНО- α согласно описанию в любой из РСТ-заявок РСТ/EP2017/056218, РСТ/EP2017/056246, РСТ/EP2017/056237 и РСТ/EP2017/056227 в первоначально поданном виде. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело представляет собой антитело против ФНО- α с вариабельным доменом легкой цепи и/или вариабельным доменом тяжелой цепи, содержащим(и) определяющие комплементарность участки (CDR) с последовательностями аминокислот согласно описанию в РСТ-заявках РСТ/EP2017/056218, РСТ/EP2017/056246, РСТ/EP2017/056237 и РСТ/EP2017/056227, в первоначально поданном виде.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело представляет собой антитело против ФНО- α с вариабельным доменом легкой цепи и/или вариабельным доменом тяжелой цепи, содержащим одну или более CDR с последовательностями аминокислот соглас-

но описанию в РСТ/EP2017/056218, РСТ/EP2017/056246, РСТ/EP2017/056237 или РСТ/EP2017/056227. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело представляет собой антитело против ФНО- α с переменным доменом легкой цепи и переменным доменом тяжелой цепи, содержащими участки CDR с последовательностями аминокислот согласно описанию в пункте формулы 2 из РСТ/EP2017/056218, пункте формулы 2 из РСТ/EP2017/056246, пункте формулы 2 из РСТ/EP2017/056237 или пункте формулы 2 РСТ/EP2017/056227, в первоначально поданном виде. Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело против ФНО- α выбрано из группы, состоящей из антител против ФНО- α , содержащих последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи и/или последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи по пункту 4 формулы РСТ/EP2017/056218, пунктам формулы 5 и 6 РСТ/EP2017/056246, пунктам формулы 5 и 6 РСТ/EP2017/056237, пункту формулы 4 РСТ/EP2017/056227, и их комбинации. Содержание каждой из международных патентных заявок РСТ/EP2017/056218, РСТ/EP2017/056246, РСТ/EP2017/056237 и РСТ/EP2017/056227 полностью включено в настоящий документ. Они включены в содержание настоящего документа.

Согласно конкретному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает: (i) домен V_L , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 3, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 4, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 5; и (ii) домен V_H , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 6, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

Согласно более предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает домен V_H с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9. Согласно другому более предпочтительному варианту реализации указанное антитело содержит домен V_L с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 10. Наиболее предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению включает: (i) домен V_H с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9; и (ii) домен V_L с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 10.

Согласно другому конкретному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает: (i) домен V_L , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 14, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 15, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 16; и (ii) домен V_H , содержащий участок CDR1 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 17, участок CDR2 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 18, и участок CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 19.

Согласно более предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает домен V_H с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 20. Согласно другому более предпочтительному варианту реализации указанное антитело содержит домен V_L с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22. Наиболее предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению включает: (i) домен V_H с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 20; и (ii) а V_L домен с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22.

Антитело согласно настоящему изобретению обладает высокой аффинностью в отношении ФНО- α человека. Термин "К_D" относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело согласно настоящему изобретению связывается с ФНО- α человека с равновесной константой диссоциации (К_D), составляющей менее чем приблизительно 2×10^{-10} М, предпочтительно менее $1,5 \times 10^{-10}$ М, предпочтительно менее $1,25 \times 10^{-10}$ М, более предпочтительно менее 1×10^{-10} М, наиболее предпочтительно менее $7,5 \times 10^{-11}$ М или даже менее 5×10^{-11} М, по оценке с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на инструменте BIACORE. В частности, определение К_D проводят согласно описанию в примере 1.

Модификации, влияющие на аффинность в отношении FcRn Антитело согласно настоящему изобретению включает последовательность аминокислот, которая отличается от природной последовательности аминокислот антитела дикого типа по меньшей мере одной "модификацией аминокислоты" согласно определению в настоящем документе. Указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты влияет на аффинность указанного антитела в отношении FcRn человека. Как правило, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты увеличивает аффинность указанного антитела в отношении FcRn человека при pH 6. Согласно одному варианту реализации указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты увеличивает аффинность указанного антитела в отношении FcRn человека при pH 6, при этом она по существу не изменяет аффинность в отношении FcRn человека при pH 7,4. Предпочтительно, указанное модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты по сравнению с последовательностью аминокислот антитела дикого типа или исходного ан-

титела, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти замен аминокислот, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти замен аминокислот. Предпочтительно, указанная по меньшей мере одна модификация аминокислоты располагается в пределах сайта связывания FcRn указанного антитела.

Указанное антитело может содержать одну или более модификаций аминокислот вне сайта связывания FcRn указанного антитела, которые влияют на связывание FcRn, например, за счет структурных изменений. Указанная модификация или модификации аминокислот могут быть получены хорошо известными способами, например, путем сайт-специфического мутагенеза согласно описанию в руководстве: "Конструирование антител - способы и протоколы" ("Antibody Engineering - Methods and Protocols", ed. Patrick Chames, 2nd ed., 2012, Chapter 31 (ISBN 978-1-61779-973-0) (ISBN 978-1-61779-973-0)).

Антитело согласно настоящему изобретению включает аминокислоту триптофан в положении 434 (нумерация EU). Указанная аминокислота в настоящем документе называется "434W". Природная аминокислота в положении 434 немодифицированных антител IgG человека представлена аспарагином (N). Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению может быть получено путем введения мутации N434W в антитело. Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению может быть получено или его получают путем замены триптофаном аспарагина в положении 434.

Антитело согласно настоящему изобретению включает аминокислоту глутаминовую кислоту в положении 428 (нумерация EU). Указанная аминокислота называется в настоящем документе "428E". Природная аминокислота в положении 428 немодифицированных антител IgG человека представлена метионином (M). Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению может быть получено путем введения мутации M428E в антитело. Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению может быть получено или его получают путем замены глутаминовой кислотой метионина в положении 428.

Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению дополнительно содержит аминокислоту аргинин в положении 311 (нумерация EU). Указанная аминокислота называется в настоящем документе "311R". Природная аминокислота в положении 311 немодифицированных антител IgG человека представлена глутамином (Q). Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению может быть получено путем введения в антитело мутации Q311R. Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению может быть получено или его получают путем замены глутамином аргинина в положении 311.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает аминокислоту 434W и аминокислоту 428E. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает аминокислоту 434W и аминокислоту 311R. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело содержит аминокислоты 434W, 428E и 311R. Указанное антитело может быть получено путем введения в антитело мутаций Q311R, M428E и N434W.

Остальная последовательность аминокислот константного домена может быть идентична природной последовательности аминокислот типичного IgG человека. Однако последовательность аминокислот указанного антитела может содержать одну или более дополнительных мутаций или замен в природной последовательности аминокислот Fc-области природного антитела, при условии, что указанное антитело все еще будет обладать ФНО- α -связывающей активностью и эффекторными функциями.

Согласно предпочтительному варианту реализации Fc-область антитела согласно настоящему изобретению, в том числе шарнирная область, содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13 или состоит из указанной последовательности.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела согласно настоящему изобретению имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11. Предпочтительно, указанное антитело дополнительно содержит легкую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому варианту реализации тяжелая цепь антитела согласно настоящему изобретению имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, указанное антитело дополнительно содержит легкую цепь с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению представляет собой нефукозилированное антитело или антитело с пониженным фукозилированием.

Термин "антитело с пониженным фукозилированием" в настоящем документе относится к антителу, в котором менее чем 90% N-гликанов указанного антитела фукозилированы. Способы определения процента фукозилирования известны в данной области техники. Предпочтительно, процент фукозилирования определяют согласно описанию в примере 11 настоящей заявки.

Согласно одному варианту реализации менее чем 75% или менее чем 50% или менее чем 25% N-гликанов указанного антитела фукозилированы. Наиболее предпочтительно, менее чем 15% N-гликанов

указанного антитела фукозилированы. Согласно конкретному варианту реализации N-гликаны антитела согласно настоящему изобретению вообще не содержат фукозы.

Предпочтительно, менее чем 90% N-гликанов в положении N297 (нумерация EU) указанного антитела фукозилированы. Согласно другому варианту реализации менее чем 75% или менее чем 50% или менее чем 25% N-гликанов в положении N297 (нумерация EU) указанного антитела фукозилированы. Наиболее предпочтительно, менее чем 15% N-гликанов в положении N297 (нумерация EU) указанного антитела фукозилированы.

Согласно другому варианту реализации N-гликаны в положении N297 указанного антитела вообще не содержат фукозы.

Нефукозилированные антитела, иногда также называемые афукозилированными антителами, могут быть получены различными способами. Например, синергетический нокдаун генов α 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) и GDP-маннозо-4,6-дегидратазы (GMD) в клетках CHO может быть использован для получения вариантов моноклональных антител, полностью афукозилированных и обеспечивающих усиленную АЗКЦ (см., например, Imai-Nishiya et al. (2007) BMC Biotechnol. 7, 84). Способ, задействующий применение нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN), расщепляющих ген FUT8 в области, кодирующей каталитическое ядро α 1,6-фукозилтрансферазы и, соответственно, нарушающих соответствующую ферментативную функцию в клетках CHO, может применяться для получения моноклональных антител, в которых полностью отсутствует коровая фукоза (см., например, Malphettes et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 106, 774-783).

Антитела с пониженным фукозилированием могут быть получены путем добавления субстратоловушки, такого как 2-дезоксидезокси-2-фтор-2-фукоза, в культуральную среду (см., например, Dekker et al. (2016) Sci Rep 6:36964), что приводит к пониженному включению фукозы в гликаны IgG-Fc.

Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению отличается высоким содержанием сиаловой кислоты. Увеличение сиалирования может быть достигнуто, например, путем одновременной трансфекции синтазой цитидинмонофосфат-сиаловой кислоты (CMP-SAS), транспортером цитидинмонофосфат-сиаловой кислоты (CMP-SAT) и α 2,3-сиалилтрансферазами (см., например, Son et al. (2011) Glycobiology 21, 1019-1028).

Аффинность в отношении FcRn.

Аффинность при pH 6 в отношении FcRn человека антитела согласно настоящему изобретению является высокой. Высокоаффинное связывание указанного антитела с FcRn человека при pH 6 характеризуется значением K_D менее 100 нМ. Предпочтительно, значение K_D высокоаффинного связывания при pH 6 составляет менее 75 нМ, или менее 50 нМ, или менее 25 нМ, или даже менее 10 нМ. Например, значение K_D , характеризующее указанную аффинность в отношении FcRn человека при pH 6, может находиться в диапазоне от 1 нМ до 500 нМ, или от 2 нМ до 100 нМ, или от 3 нМ до 50 нМ, или от 4 нМ до 25 нМ, или от 5 нМ до 10 нМ.

Согласно предпочтительному варианту реализации аффинность антитела согласно настоящему изобретению в отношении FcRn человека при pH 6 выше аффинности инфликсимаба в отношении FcRn человека при pH 6,0.

Аффинность антитела согласно настоящему изобретению в отношении FcRn человека предпочтительно определяют путем поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например, согласно описанию в примере 4 в настоящей заявке.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, отличается низкой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 7,4. Указанная низкая аффинность характеризуется значением K_D , превышающим 1 мкМ. Предпочтительно, указанная низкая аффинность в отношении FcRn человека при pH 7,4 характеризуется значением K_D выше 2 мкМ, или выше 5 мкМ, или выше 10 мкМ.

Согласно конкретному варианту реализации указанная низкая аффинность является настолько низкой, что значение K_D не может быть определено с применением ППР.

Согласно специфическому варианту реализации соотношение: (i) значения K_D для связывания антитела согласно настоящему изобретению с FcRn человека при pH 7,4 и (ii) значения K_D для связывания с FcRn человека при pH 6,0, составляет по меньшей мере 100. Предпочтительно, указанное соотношение составляет по меньшей мере 200, или по меньшей мере 300, или по меньшей мере 400, или по меньшей мере 500, или по меньшей мере 600, или по меньшей мере 700, или по меньшей мере 800, или по меньшей мере 900, или по меньшей мере 1000.

Функциональные свойства антитела.

Антитело согласно настоящему изобретению эффективно транспортируется через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне. Как правило, оно транспортируется через монослой поляризованных клеток в большем количестве, чем инфликсимаб, при этом количество антитела инфликсимаба относится к массе/см² монослоя поляризованных клеток. Количество антитела, транспортируемое через монослой поляризованных клеток, относительно количества инфликсимаба, транспортируемого через монослой поляризованных клеток, составляет по меньшей мере 110%, предпочтительно по меньшей мере 125%, более предпочтительно по меньшей мере 150%, или по мень-

шей мере 175%, или по меньшей мере 200% (при этом количество транспортируемого инфликсимаба принимают за 100%).

Кроме того, указанное антитело специфическим образом транспортируется через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в присутствии избытка конкурирующих иммуноглобулинов. В настоящем документе это называется специфическим транспортом.

Процент от общей массы иммуноглобулинов, транспортируемой через монослой поляризованных клеток, выше, чем процент инфликсимаба, транспортируемого через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в присутствии 10-кратного избытка конкурирующих иммуноглобулинов. Процент антитела согласно настоящему изобретению, транспортируемого через монослой поляризованных клеток в присутствии 10-кратного избытка неродственных иммуноглобулинов относительно процента инфликсимаба, транспортируемого через монослой поляризованных клеток в присутствии 10-кратного избытка неродственных антител, составляет по меньшей мере 150%, или по меньшей мере 200%, или по меньшей мере 250%, или по меньшей мере 300% (значение для инфликсимаба принимают за 100%).

Предпочтительно, монослой поляризованных клеток представляет собой монослой поляризованных клеток T84. Анализ транспорта, имитирующий процесс транцитоза, может быть проведен согласно описанию в примере 5 в настоящей заявке.

Антитело согласно настоящему изобретению связывается с CD64, CD32a(H), CD32a(R), CD32b, CD16a(V), CD16a(F) и CD16b(NA2).

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD64 с K_D менее 100 нМ, предпочтительно менее 10 нМ.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD32a(H) с K_D менее 10 мкМ.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD32a(R) с K_D менее 10 мкМ.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD32b с K_D менее 10 мкМ.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD16a(V), например, с K_D менее 500 нМ, предпочтительно менее 100 нМ.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD16a(F), например, с K_D менее 10 мкМ, предпочтительно менее 1 мкМ.

Антитело согласно настоящему изобретению, как правило, связывается с CD16b(NA2), например, с K_D менее 10 мкМ, предпочтительно менее 1 мкМ.

Антитело согласно настоящему изобретению дополнительно связывается с C1q человека. Предпочтительно, указанное связывание сильнее связывания инфликсимаба с C1q человека.

Антитело согласно настоящему изобретению дополнительно отличается комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ) в отношении комплемента кролика. Указанная КЗЦ антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно выше КЗЦ инфликсимаба, как следует из относительной EC_{50} и/или относительной максимальной гибели.

Антитело согласно настоящему изобретению дополнительно способно индуцировать макрофаги $CD14^+CD206^+$. Уровень индукции предпочтительно сопоставим с уровнем индукции, равен уровню индукции или выше уровня индукции инфликсимабом.

Антитело согласно настоящему изобретению дополнительно способно подавлять пролиферацию Т-клеток. Степень подавления пролиферации Т-клеток предпочтительно сопоставима со степенью, равна степени или выше степени подавления пролиферации Т-клеток инфликсимабом.

Фармацевтические композиции и лечение.

Лечение заболевания включает лечение пациентов, у которых уже диагностирована любая форма указанного заболевания на любой клинической стадии или с любым клиническим проявлением; задержку манифестации, или развития, или обострения, или ухудшения симптомов или признаков заболевания; и/или предотвращение, и/или снижение тяжести заболевания.

"Субъект" или "пациент", которому вводят антитело против ФНО- α , может представлять собой млекопитающее, например, не являющееся приматом (например, корову, свинью, лошадь, кошку, собаку, крысу и т.п.) или являющееся приматом (например, обезьяну или человека). Согласно определенным аспектам человек представляет собой педиатрического пациента. Согласно другим аспектам человек представляет собой взрослого пациента.

Композиции, содержащие антитело против ФНО- α и, необязательно, один или более дополнительных терапевтических агентов, таких как вторые терапевтические агенты, описанные ниже, описанные в настоящем документе. Указанные композиции, как правило, входят в состав стерильной фармацевтической композиции, которая включает фармацевтически приемлемый носитель. Указанная композиция может находиться в любой подходящей форме (в зависимости от требуемого способа введения его пациенту).

Указанные антитела против ФНО- α могут быть введены пациенту различными маршрутами, например, перорально, чрескожно, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, интратекально, местно или локально, например, через слизистую оболочку. Наиболее подходящий маршрут введения в том или ином случае зависит от конкретного антитела, субъекта, а также природы и тяжести заболевания и физического состояния субъекта. Как правило, антитело против ФНО- α вводят внутривенно.

Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению вводят перорально. Если введение осуществляют перорально, указанное антитело предпочтительно представляет собой IgG, наиболее предпочтительно - IgG₁.

Согласно типичным вариантам реализации антитело против ФНО- α присутствует в фармацевтическая композиция в концентрации, достаточной для того, чтобы обеспечить возможность внутривенного введения в количестве от 0,5 мг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антитела, подходящая для применения в композициях и способах, описанных в настоящем документе, включает, не ограничиваясь перечисленными, концентрации 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, или концентрацию в диапазоне между любыми из перечисленных выше значений, например, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, от 5 мг/кг до 15 мг/кг, или от 10 мг/кг до 18 мг/кг.

Эффективная доза антитела против ФНО- α может варьировать от приблизительно 0,001 до приблизительно 750 мг/кг на одно (например, болюсное) введение, несколько введений или непрерывное введение, или обеспечивать достижение концентрации в сыворотке 0,01-5000 мкг/мл на одно (например, болюсное) введение, несколько введений или непрерывное введение, или соответствует любому эффективному диапазону или значению в зависимости от состояния, лечение которого проводят, маршрута введения и возраста, массы тела и состояния субъекта. В случае перорального введения концентрация в сыворотке может быть очень низкой или даже ниже предела детекции. Согласно некоторым вариантам реализации каждая доза может варьировать от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 50 мг на килограмм массы тела, или от приблизительно 3 мг до приблизительно 30 мг на килограмм масса тела. Указанное антитело может быть получено в виде водного раствора.

Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению вводят перорально. Если введение осуществляют перорально, указанное антитело предпочтительно представляет собой IgG, наиболее предпочтительно - IgG₁. Если указанное антитело вводят перорально, ежедневная доза антитела, как правило, находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,16 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг массы тела. Обычно предпочтительные дозы представлены дозами от 1 до 200 мг в сутки, предпочтительно, составляют 5-100 или 10-50 мг в сутки.

Фармацевтические композиции могут быть удобным образом представлены в единичных дозированных формах, содержащих заранее заданное количество антитела против ФНО- α на дозу. Такая единица может содержать от 0,5 мг до 5 г, например, но без ограничений, 1 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 750 мг, 1000 мг антитела, или количество антитела в любом диапазоне между любыми двумя из вышеперечисленных значений, например, от 10 мг до 1000 мг, от 20 мг до 50 мг, или от 30 мг до 300 мг. Фармацевтически приемлемые носители могут принимать самые разнообразные формы, в зависимости, например, от состояния, подлежащего лечению, или маршрута введения.

Определение эффективной дозировки, общего количества доз и продолжительности лечения соответствующим антителом против ФНО- α находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники и может быть осуществлено с применением стандартного исследования с увеличением дозы.

Терапевтические составы с антителами против ФНО- α , подходящие для применения в способах, описанных в настоящем документе, могут быть подготовлены для хранения в виде лиофилизированных составов или водных растворов путем смешивания антитела, обладающего требуемой степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, как правило, используемыми в данной области техники (все из которых называются в настоящем документе "носителями"), т.е. буферными агентами, стабилизирующими агентами, консервантами, изотонирующими агентами, неионными детергентами, антиоксидантами и различными другими добавками. См. источник: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980). Такие добавки должны быть нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

Буферные агенты помогают поддерживать pH в диапазоне, приближенном к физиологическим условиям. Они могут присутствовать в концентрации в диапазоне от приблизительно 2 мМ до приблизительно 50 мМ. Подходящие буферные агенты включают как органические, так и неорганические кисло-

ты, и их соли, такие как цитратные буферы (например, смесь цитрата мононатрия и цитрата динатрия, смесь лимонной кислоты и цитрата тринатрия, смесь лимонной кислоты и цитрата мононатрия, и т.п.), цитрат-фосфатные буферы, сукцинатные буферы (например, смесь янтарной кислоты и сукцината мононатрия, смесь янтарной кислоты и гидроксида натрия, смесь янтарной кислоты и сукцината динатрия, и т.п.), тартратные буферы (например, смесь винной кислоты и тартрата натрия, смесь винной кислоты и тартрата калия, смесь винной кислоты и гидроксида натрия, и т.п.), fumarатные буферы (например, смесь fumarовой кислоты и fumarата мононатрия, смесь fumarовой кислоты и fumarата динатрия, смесь fumarата мононатрия и fumarата динатрия, и т.п.), глюконатные буферы (например, смесь глюконовой кислоты и глюконата натрия, смесь глюконовой кислоты и гидроксида натрия, смесь глюконовой кислоты и глюконата калия, и т.п.), оксалатный буфер (например, смесь щавелевой кислоты и оксалата натрия, смесь щавелевой кислоты и гидроксида натрия, смесь щавелевой кислоты и оксалата калия, и т.п.), лактатные буферы (например, смесь молочной кислоты и лактата натрия, смесь молочной кислоты и гидроксида натрия, смесь молочной кислоты и лактата калия и т.п.) и ацетатные буферы (например, смесь уксусной кислоты и ацетата натрия, смесь уксусной кислоты и гидроксида натрия, и т.п.). Кроме того, могут применяться фосфатные буферы, гистидиновые буферы и соли триметиламина, такие как Tris.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну соль, например, хлорид натрия. Концентрация соли предпочтительно варьирует от 100 мМ до 200 мМ, например, составляет приблизительно 150 мМ.

Консерванты могут быть добавлены для задержки роста микроорганизмов, и могут быть добавлены в количествах в диапазоне от 0,2% до 1% (мас./об.). Подходящие консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензилхлорид аммония, галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, и йодид), хлорид гексаметония; и алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол и 3-пентанол. Изотонирующие агенты, иногда называемые "стабилизаторами", могут быть добавлены для обеспечения изотоничности жидких композиций и включают многоатомные сахарные спирты, предпочтительно, трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит. Стабилизаторы относятся к широкой категории вспомогательных веществ, функция которых может варьировать от объемообразующего агента до добавки, которая солюбилизирует терапевтический агент или помогает предотвращать денатурацию или адгезию к стенке контейнера. Типичные стабилизаторы могут представлять собой многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.п., органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин и т.п., в том числе циклиты, такие как инозит; полиэтиленгликоль; полимеры аминокислот; серосодержащие восстанавливающие агенты, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, натрия тиогликолят, тиоглицерин, α-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (например, пептиды из 10 остатков или менее); белки, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза, и трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстран. Стабилизаторы могут присутствовать в количестве в диапазоне от 0,1 до 10 000 частей массы на часть массы активного белка.

Могут быть добавлены неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие агенты"), помогающие солюбилизовать терапевтический агент, а также защитить терапевтический белок от индуцированной встряхиванием агрегации, что также позволяет подвергать состав поверхностному сдвиговому напряжению без денатурации белка. Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 80 и т.п.), полиоксамеры (184, 188 и т.п.), плуроники-полиолы, простые моноэфирные полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т.п.). Неионные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл, или в диапазоне от приблизительно 0,07 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл.

Различные дополнительные вспомогательные вещества включают объемообразующие агенты (например, крахмал), хелатирующие агенты (например, ЭДТК), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метионин, витамин E), ингибиторы протеазы и вспомогательные растворители.

Состав согласно настоящему документу может также содержать второй терапевтический агент наряду с соответствующим антителом против ФНО-α. Примеры подходящих вторых терапевтических агентов приведены ниже.

Схема дозирования может варьировать от дозирования один раз в месяц до ежедневного, в зависимости от ряда клинических факторов, в том числе типа заболевания, тяжести заболевания и чувствительности пациента к указанному антителу против ФНО-α. Согласно конкретным вариантам реализации соответствующее антитело против ФНО-α вводят ежедневно, два раза в неделю, три раза в неделю, один

раз в два дня, каждые 5 дней, один раз в неделю, каждые 10 дней, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели или один раз в месяц; или количество введений соответствует любому диапазону между любыми двумя из перечисленных значений, например, антитело вводят каждые четыре дня - каждый месяц, каждые 10 дней - каждые две недели, или от двух до трех раз в неделю, и т.п.

Дозировка антитела против ФНО- α для введения варьирует в зависимости от конкретного антитела, субъекта, природы и тяжести заболевания, физического состояния субъекта, терапевтического режима (например, от того, используют ли второй терапевтический агент) и выбранного маршрута введения; подходящая дозировка может быть легко определена специалистом в данной области техники.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что оптимальное количество и распределение индивидуальных доз соответствующего антитела против ФНО- α должно быть определено на основании природы и выраженности состояния, лечение которого проводят, формы, маршрута и сайта введения, возраста и состояния конкретного субъекта, лечение которого проводят, и что в конечном итоге подходящие для применения дозировки будут определять лечащий врач. Введение указанной дозы можно повторять с необходимой частотой. При развитии побочных эффектов количество и/или частота введения дозы могут быть изменены или уменьшены, в соответствии с обычной клинической практикой.

Расстройства, подлежащие лечению.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения связанного с ФНО- α человека заболевания у субъекта, включающий введение субъекту антитела согласно определению в настоящем документе. Термин "связанное с ФНО- α расстройство" или "связанное с ФНО- α заболевание" относится к любому расстройству, манифестации, прогрессированию или персистенции симптомов или болезненных состояний, которые требуют участия ФНО- α . Примеры связанных с ФНО- α расстройств включают, не ограничиваясь перечисленными, хронический и/или аутоиммунный статус воспаления в целом, иммуно-опосредованные воспалительные расстройства в целом, воспалительное заболевание ЦНС, воспалительные заболевания, влияющие на глаза, суставы, кожу, слизистые мембраны, центральную нервную систему, желудочно-кишечный тракт, мочевыводящие пути или легкие, состояния увеита в целом, ретинит, увеит HLA-B27+, болезнь Бехчета, синдром сухого глаза, глаукому, синдром Шегрена, сахарный диабет (в том числе диабетическую нейропатию), инсулинорезистентность, состояния артрита в целом, ревматоидный артрит, остеоартрит, реактивный артрит и синдром Рейтера, ювенильный артрит, анкилозирующий спондилит, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, тяжелую миастению, амиотрофический боковой склероз, саркоидоз, гломерулонефрит, хроническую болезнь почек, цистит, псориаз (в том числе псориатический артрит), гнойный гидраденит, панникулит, гангренозную пиодермию, синдром SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остит), акне, синдром Свита, пузырчатку, болезнь Крона (в том числе внекишечные проявления), язвенный колит, бронхиальную астму, пневмонит гиперчувствительности, общие аллергии, аллергический ринит, аллергический синусит, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), фиброз легких, гранулематоз Вегенера, синдром Кавасаки, гигантоклеточный артериит, васкулит Черджа-Стросс, узелковый полиартериит, ожоги, болезнь "трансплантат против хозяина", реакций "хозяин против трансплантата", эпизоды отторжения после трансплантации органа или костного мозга, системные и локальные состояния васкулита в целом, системную и кожную эритематозную волчанку, полимиозит и дерматомиозит, склеродермию, преэклампсию, острый и хронический панкреатит, вирусный гепатит, алкогольный гепатит, послеоперационное воспаление, например, после хирургической операции на глазах (например, хирургического лечения катаракты (замены хрусталика глаза) или глаукомы), хирургической операции на суставах (в том числе артроскопической хирургии), хирургической операции на связанных с суставами структурах (например, на связках), челюстно-лицевой и/или стоматологической хирургической операции, минимально инвазивных процедур на сердечно-сосудистой системе (например, ЧТКА, атерэктомии, установки стента), лапароскопических и/или эндоскопических внутрибрюшинных и гинекологических процедур, эндоскопических урологических процедур (например, после хирургической операции на предстательной железе, уретероскопии, цистоскопии, интерстициального цистита); или периоперационное воспаление (предотвращение периоперационного воспаления) в целом, буллезный дерматит, нейтрофильный дерматит, токсический эпидермальный некролиз, пустулезный дерматит, церебральную малярию, гемолитический уремический синдром, отторжение аллотрансплантата, средний отит, змеиный укус, узелковую эритему, миелодиспластические синдромы, первичный склерозирующий холангит, серонегативную спондилоартропатию, аутоиммунную гемолитическую анемию, орофациальный гранулематоз, вегетирующий гнойный стоматит, афтозный стоматит, географический язык, мигрирующий стоматит, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, паралич Белла, болезнь Крейцфельда-Якоба и нейродегенеративные состояния в общем.

Связанный с раком остеолит, связанное с раком воспаление, связанная с раком боль, связанная с раком кахексия, метастазы в кость, острые и хронические формы боли, независимо от того, вызваны ли они центральными или периферическими эффектами ФНО- α , и от их классификации как воспалительных, ноцицептивных или нейропатических форм боли, ишиас, боль в пояснично-крестцовой области, синдром запястного канала, комплексный регионарный болевой синдром (КРБС), подагра, постгерпетическая

невралгия, фибромиалгия, локальные болевые состояния, хронические болевые синдромы из-за метастатической опухоли, дисменорея.

Конкретные расстройства, подлежащие лечению, включают состояния артрита в целом, ревматоидный артрит, остеоартрит, реактивный артрит, ювенильный артрит; псориаз, в том числе псориагический артрит; воспалительное заболевание кишечника, в том числе болезнь Крона, язвенный колит, в том числе проктит, сигмоидит, проктосигмоидит, левосторонний колит, обширный колит и панколит, неопределенный колит, микроскопический колит, в том числе коллагенозный колит и лимфоцитарный колит, колит при заболевании соединительной ткани, диверсионный колит, колит при дивертикулярной болезни, эозинофильный колит и воспаление илеоанального кармана.

Наиболее предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению применяют для лечения воспалительного заболевания кишечника, в частности, болезни Крона, язвенного колита или микроскопического колита. Болезнь Крона может представлять собой болезнь подвздошной кишки, ободочной кишки, тонкого и толстого кишечника или изолированную болезнь Крона верхних отделов ЖКТ (желудка, двенадцатиперстной кишки и/или тощей кишки), в том числе без образования стриктур/непроникающую, с образованием стриктур, проникающую и периаанальную болезнь, с допущением любой комбинации локализации и любых из вышеупомянутых вариантов поведения заболевания. Язвенный колит может представлять собой язвенный проктит, проктосигмоидит, левосторонний колит, язвенный панколит и воспаление илеоанального кармана.

Комбинированная терапия и другие аспекты.

Предпочтительно, пациент, лечение которого проводят соответствующим антителом против ФНО- α , также получает лечение другим стандартным медикаментом. Например, пациент, страдающий воспалительным заболеванием кишечника, в частности, при тяжести заболевания от умеренной до серьезной, как правило, также получает лечение месалазином, или его производными или пролекарствами, кортикостероидами, например, будесонидом или преднизолоном (перорально или внутривенно), иммунодепрессантами, например, азатиоприном/6-меркаптопурином (6-МР); или метотрексатом, циклоспорином или такролимусом. Другие медикаменты, которые могут вводиться пациенту совместно с соответствующим антителом, включают другие антитела против ФНО- α (например инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб пегол, голимумаб), интегрин антагонисты (например натализумаб, ведолизумаб), антитела против ИЛ-23 (например, MEDI2070), антитела против $\beta 7$ (например, этролизумаб), ингибиторы JAK в пути JAK/STAT (например, тофацитиниб); и другие. Дополнительные медикаменты, которые могут вводиться пациенту совместно с соответствующим антителом, включают иммуносупрессоры (например, азатиоприн/6-МР, или метотрексат, или пероральный циклоспорин) для поддержания стабильной и более длительной ремиссии. Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела против ФНО- α согласно описанию выше в тексте настоящего документа для уменьшения воспаления.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела против ФНО- α согласно описанию выше в тексте настоящего документа для уменьшения воспаления у пациента, страдающего воспалительным состоянием.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного состояния, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против ФНО- α согласно описанию выше в тексте настоящего документа. Указанное воспалительное состояние предпочтительно представляет собой одно из состояний, описанных выше.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к способу предотвращения воспалительного состояния, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против ФНО- α согласно описанию выше в тексте настоящего документа. Указанное воспалительное состояние предпочтительно представляет собой одно из состояний, описанных выше.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к способу улучшения трансцитоза антитела, направленного против ФНО- α , включающий введение замен Q311R, M428E и N434W в последовательность аминокислот указанного антитела для получения модифицированного антитела, характеризующегося улучшенным трансцитозом. Модифицированное антитело предпочтительно представляет собой антитело согласно описанию выше в тексте настоящего документа.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к способу увеличения времени полужизни в плазме антитела, направленного против ФНО- α , включающему введение замен Q311R, M428E и N434W в последовательность аминокислот указанного антитела для получения модифицированного антитела с продленным временем полужизни в плазме. Указанное модифицированное антитело предпочтительно представлено антителом согласно описанию выше в тексте настоящего документа. Время полужизни в плазме может быть увеличено по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50% относительно времени полужизни в плазме немодифицированного антитела (т.е. исходного антитела, в котором отсутствуют замены Q311R, M428E и N434W).

Обзор последовательностей из перечня последовательностей

SEQ ID NO:	Описание последовательности аминокислот
1	Легкая цепь Ab-wt, исходного антитела для модифицированных антител, использованного в примерах
2	Тяжелая цепь Ab-wt, исходного антитела для модифицированных антител, использованного в примерах
3	CDR L1 из клона 16-22-H05
4	CDR L2 из клона 16-22-H05
5	CDR L3 из клона 16-22-H05
6	CDR H1 из клона 16-22-H05
7	CDR H2 из клона 16-22-H05
8	CDR H3 из клона 16-22-H05
9	V _H гуманизированного IgG из клона 16-22-H05
10	V _L гуманизированного IgG из клона 16-22-H05
11	Тяжелая цепь Ab-REW (на основе из клона 16-22-H05)
12	Тяжелая цепь Ab-REW (на основе из клона 17-22-B03)
13	Fc-область Ab-REW (в том числе шарнирная область)
14	CDR L1 из клона 17-22-B03
15	CDR L2 из клона 17-22-B03
16	CDR L3 из клона 17-22-B03
17	CDR H1 из клона 17-22-B03
18	CDR H2 из клона 17-22-B03
19	CDR H3 из клона 17-22-B03
20	V _H гуманизированного IgG из клона 17-22-B03
21	V _L гуманизированного IgG из клона 17-22-B03 (sc08)
22	V _L гуманизированного IgG из клона 17-22-B03 (sc02)
23	Легкая цепь гуманизированного IgG из клона 17-22-B03 (sc08)
24	Легкая цепь гуманизированного IgG из клона 17-22-B03 (sc02)

Примеры

Варианты антител.

Несколько вариантов антитела против ФНО- α (здесь и далее в настоящем документе называемого "исходным антителом", или "Ab-wt") получали путем введения замен в последовательность аминокислот Fc-области указанного антитела. Легкая цепь Ab-wt имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, а тяжелая цепь Ab-wt имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 2. Указанные мутации вводили путем сайт-специфического мутагенеза в применении общеизвестных способов. Вкратце, мутации вводили с применением ПЦР. Прямой праймер конструировали таким образом, чтобы он содержал заданную мутацию, а обратный праймер конструировали таким образом, чтобы при отжиге 5'-концы указанных двух праймеров располагались один за другим (но не перекрывались) (фиг. 9). Проводили 25 циклов ПЦР (98°C в течение 10 с, 64°C в течение 30 с, 72°C в течение 3 минут). Перед проведением продукта ПЦР через агарозный гель, немутированную ПЦР-матрицу удаляли из пула продуктов ПЦР с использованием рестрикционного фермента DpnI. После очищения на геле продукта ПЦР тупые концы лигировали с получением циркуляризованной плазмиды, которой трансформировали компетентные клетки *E. coli*. После инкубации в течение ночи собирали несколько колоний, выделяли плазмидную ДНК и секвенировали для подтверждения включения мутации.

Нефукозилированные варианты получали путем добавления 0,15 мМ субстрата-ловушки 2-дезоксидеозы в культуральную среду (Dekkers et al. (2016) *Sci Rep* 6:36964). Это приводило к значимому снижению включения фукозы в гликан IgG-Fc, как показано на примере 11 ниже в настоящем документе.

Таблица 2

Полученные варианты антител против ФНО- α (нумерация EU)

Обозначение	Мутации относительно исходного антитела
Ab-wt*	Отсутствуют (= исходное антитело)
Ab-REW**	Q311R/M428E/N434W
Ab-REW-2FF**	Нефукозилированный вариант Ab-REW

* Антитело не соответствует настоящему изобретению;

** антитело в соответствии с настоящим изобретением.

Антитела Ab-REW и Ab-REW-2FF представляют собой антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Пример 1. Аффинность в отношении ФНО- α .

Способ.

Аффинность в отношении ФНО- α измеряли с применением Biacore. CM5-чип получали с применением стандартных процедур иммобилизации Biacore с аминами. После встраивания CM5-чипа систему праймировали и затем нормализовали раствором "BIA normalizing solution" (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Чип добавляли в систему с подвижным буфером ФСБ-Т; перед иммобилизацией поверхность чипа праймировали, трехкратно вводя по 50 мМ NaOH. Белок А иммобилизовали на поверхности чипа. С этой целью белок разводили до 5 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере при pH 4,5 и вводили, чтобы получить ответ в виде связывания ~1000 RU во всех 4 проточных ячейках. Для удаления нековалентно связанного материала из всех проточных ячеек с чипом проводили три 15-секундных промывания 50 мМ NaOH. На чипе с белком А захват антитела проводили в проточных ячейках 2 и 4, а проточные ячейки 1 и 3 использовали для вычитания референсных значений. Испытуемые антитела разводили в ФСБ-Т до концентрации 10 нМ и вводили 2,5-7,5 мкл для получения 120 RU захваченного антитела. Получали раствор аналита ФНО- α с концентрацией 500 мкг/мл в воде согласно указаниям поставщика и дополнительно разводили подвижным буфером ФСБ-Т. Кинетику одного цикла использовали для оценки аффинности в состоянии равновесия. Для анализа каждого цикла поверх лиганда вводили титрованные растворы аналита с 5 концентрациями и затем измеряли диссоциацию комплекса. Поверхность регенерировали с использованием глицина с pH 1,7. Использовали способ двойной калибровки, согласно которому данные для связанной с лигандом поверхности для захвата (проточные ячейки 2 и 4) вычитали из данных для референсных поверхностей без захваченного лиганда (проточные ячейки 1 и 3 соответственно). Каждые 3-4 цикла вводили холостой буферный раствор, а затем вычитали значения из значений для циклов введения аналита для коррекции незначительных изменений в поверхности для захвата лиганда. Для проверки образца на разложение или изменений в работе прибора использовали повторные введения аналита в начале и конце каждого аналитического запуска. Весь анализ проводили при 25°C и держатель с образцами инкубировали при 10°C в ходе экспериментальных запусков. Каждый эксперимент повторяли по меньшей мере три раза. Для аппроксимации итоговых кинетических данных использовали модель связывания 1:1.

Результаты.

Все антитела демонстрировали аналогичную кинетику связывания с ФНО- α , что свидетельствовало о том, что ни одна из введенных модификаций не приводила к значимым изменениям в антигенсвязывающей области. Скорость диссоциации для антитела Ab-REW-2FF не поддается измерению, соответственно, аффинность (K_D) не может быть определена. Однако скорость связывания была сопоставимой со скоростью связывания других антител, что свидетельствовало о том, что введение мутации значимо не влияло на связывание.

Таблица 3

Кинетика связывания вариантов IgG1 человека и ФНО- α по оценке с применением ППП

	k_a ($10^6/мс$)	k_d ($10^{-5}/с$)	K_D (нМ)
Ab-wt	8,37 \pm 0,11	3,45 \pm 0,20	4,13 \pm 0,19
Ab-REW	6,22 \pm 0,91	2,04 \pm 0,52	3,30 \pm 0,74
Ab-REW-2FF	5,80 \pm 0,58	н.о.*	н.о.*

* Скорость диссоциации (k_d) не может быть определена.

Пример 2. Активность.

Способ.

Клетки L929 инкубировали с 0,25 нг/мл ФНО- α и 1 мкг/лунку актиномицина D в присутствии серийных разведений вариантов антител против ФНО- α . После инкубации в течение 20 часов при 37°C/5% CO₂ измеряли пролиферативные ответы с применением MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолия и реагента для сопряжения электронов (фена-

зинэтосульфат, ФЭС). MTS преобразовывали в формазановый продукт дегидрогеназные ферменты, присутствующие в метаболически активных клетках. Количество формазанового продукта по оценке на основании поглощения при 492 нм прямо пропорционально числу живых клеток в культуре.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 1. Введение мутаций в Fc-область указанного антитела против ФНО- α не влияло на активность.

Пример 3. Аффинность в отношении Fc γ -рецепторов (CD64, CD32a, CD32b, CD16a, CD16b).

Способ.

Аффинность в отношении Fc γ R измеряли с помощью Biacore. CM5-чип получали с применением стандартных процедур иммобилизации Biacore с аминами. После встраивания CM5-чипа систему примирировали и затем нормализовали раствором "BIA normalizing solution" (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Чип добавляли в систему с подвижным буфером - забуференным фосфатом соевым раствором с Tween-20 (ФСБ-Т); перед иммобилизацией поверхность чипа примирировали, трехкратно вводя по 50 мМ NaOH 50 мМ NaOH. Fc γ R иммобилизовали на поверхности чипа с применением системы захвата с гистидиновыми метками. Чип с антителом к гистидиновой метке получали в соответствии с инструкциями в наборе Biacore, с осаждением ~12000 RU указанного антитела на всех 4 проточных ячейках. Для удаления нековалентно связанного материала из всех проточных ячеек с чипом проводили три 30-секундных промывания 10 мМ глицином с pH 1,5. Fc γ -рецепторы разводили в ФСБ-Т до концентрации в диапазоне 0,5-2 мкг/мл, и вводили по 2,5-5,0 мкл на чип для получения уровней захвата от 60 до 200 RU. Антитела перед анализом разводили в ФСБ-Т. Кинетику одного цикла использовали для оценки аффинности в состоянии равновесия. Для анализа каждого цикла поверх Fc γ R-лиганда вводили титрованные растворы антитела с 5 концентрациями и затем измеряли диссоциацию комплекса. Поверхность регенерировали с применением 10 мМ раствора глицина с pH 1,5, рекондендованного для покрытой антителами против His поверхности для захвата. Использовали способ двойной калибровки, согласно которому данные для связанной с лигандом поверхности для захвата (проточные ячейки 2 и 4) вычитали из данных для референсных поверхностей без захваченного лиганда (проточные ячейки 1 и 3, соответственно). В каждом цикле титрования антитела вводили холостой буферный раствор, а затем вычитали значения из значений для циклов введения аналита, для коррекции незначительных изменений в поверхности для захвата лиганда. Весь анализ проводили при 25°C и держатель с образцами инкубировали при 10°C в ходе экспериментальных запусков. Каждый эксперимент повторяли по меньшей мере три раза.

Результаты.

Связывание с CD64 сконструированных антител против ФНО- α не было нарушено. Введение мутаций не влияло на аффинность в отношении CD32a(H), CD32a(R) и CD32b. Однако Ab-REW-2FF продемонстрировало 5,5-кратное повышение аффинности в отношении CD16a(V). Нефукозилированное антитело Ab-REW-2FF также отличалось улучшенным связыванием с низкоаффинным рецептором CD16a и с CD16b.

Таблица 4

Аффинность в отношении Fc γ -рецепторов CD64, CD32a(H), CD32a(R) и CD32b по оценке с применением ППР. Приведены средние значения аффинности и стандартное отклонение, вычисленные на основании двух или более независимых экспериментов

	Аффинность (K_D)			
	CD64 (нМ)	CD32a(H) (мкМ)	CD32a(R) (мкМ)	CD32b (мкМ)
Ab-wt	2,92 \pm 0,07	0,67 \pm 0,04	н.о.	3,14 \pm 0,80
Ab-REW	2,80 \pm 0,24	0,78 \pm 0,05	1,60 \pm 0,01	1,21 \pm 0,32
Ab-REW-2FF	2,93 \pm 0,16	1,87 \pm 0,37	1,45 \pm 0,01	1,13 \pm 0,25

Таблица 5

Аффинность в отношении Fc γ -рецепторов CD16a(V), CD16a(F) и CD16b по оценке с применением ППР. Приведены средние значения аффинности и стандартное отклонение, вычисленные на основании двух или более независимых экспериментов

	Аффинность (K _D)		
	CD16a(V)	CD16a(F)	CD16b(NA2)
	(нМ)	(мкМ)	(мкМ)
Ab-wt	184 ± 31,9	н.о.	> 3,00
Ab-REW	280 ± 36,1	2,41 ± 0,68	1,65 ± 0,36
Ab-REW-2FF	33,5 ± 0,99	0,15 ± 0,01	0,40 ± 0,07

Пример 4. Аффинность в отношении FcRn.

Способ.

ППР проводили с применением инструмента Biacore 3000 с сенсорными CM5-чипами, сопряженными с антителами IgG1 против ФНО- α (~500 резонансных единиц (RU)) с использованием химии сопряжения аминов согласно описанию производителя. Сопряжение осуществляли путем введения 2,0 мкг/мл каждого белка в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, с применением набора для сопряжения аминов (GE Healthcare). Буфер HBS-P с pH 7,4 (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20) или фосфатный буфер с pH 6,0 (67 нМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, 0,005% Tween 20) использовали в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Кинетику связывания определяли путем введения титрованных количеств (от 1000 до 31,2 нМ) мономерного FcRn человека (hFcRn) поверх иммобилизованных антител при pH 7,4 или pH 6,0. Все эксперименты с ППР проводили при 25°C со скоростью потока 40 мкл/мин. Данные о связывании приводили к нулю, и вычитали значение для референсной ячейки. Для определения кинетики связывания использовали модель связывания лигандов Ленгмюра 1:1, включенную в программное обеспечение BIAevaluation (версия 4.1).

Результаты.

Результаты показали, что антитело дикого типа Ab-wt строго pH-зависимым образом связывалось с hFcRn. Все сконструированные варианты антител отличались более высокой аффинностью в отношении FcRn при pH 6,0, однако сохраняли зависимость от pH и не связывались с рецептором при pH 7,4. Неожиданным образом, содержащие REW варианты продемонстрировали более чем в 160 раз более сильное связывание при кислотных значениях pH, при отсутствии в то же самое время детектируемого связывания в протестированных условиях при нейтральном значении pH. Указанные варианты антител продемонстрировали улучшенное связывание с FcRn по сравнению с инфликсимабом, который содержит Fc-область IgG1 дикого типа.

Таблица 6

Аффинность вариантов антител против ФНО- α в отношении FcRn при pH 6,0 и pH 7,4 по оценке с применением ППР

	pH 6,0		Кратность изменения относительно IFX	pH 7,4 K _D (нМ)
	K _D (нМ)	Кратность изменения относительно wt		
Ab-wt	1000			Н/Р
Ab-REW	5,61	178	75,8	Н/Р
Ab-REW-2FF	6,24	160	68,1	Н/Р
IFX	425			Н/Р

Н/Р: не регистрируется из-за слабого связывания.

Пример 5. Трансцитоз.

Способ.

Фильтры Transwell (1,12 см²) с покрытыми коллагеном политетрафторэтиленовыми (ПТФЭ) мембранами с размером пор 0,4 мкм инкубировали в течение ночи в полной ростовой среде с последующим высеванием 1,0 × 10⁶ клеток Т84 на лунку. Ежедневно проводили мониторинг трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) с применением вольтметра MILLICELL-ERS-2. Культуры выращивали на протяжении 4-5 дней до достижения конfluence с значением TEER ~1000-1300 Ом × см². Перед экспериментами монослой подвергали голоданию в течение 1 часа в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS). Затем 400 нМ вариантов антител или IFX по отдельности или совместно с 4000 нМ белком IgG-миеломы человека с нерелевантной специфичностью добавляли в апикальную камеру Transwell. Образцы собирали из базолатерального резервуара через 0 ч и 4 ч после добавления. Концен-

трации антитела в базолатеральном резервуаре определяли с применением ИФА ELISA. Вкратце, 96-луночные планшеты MaxiSorp покрывали в течение ночи либо рекомбинантным ФНО- α , либо Fc-специфическим антителом козы против антител человека, разведенными до 1 мкг/мл в ФСБ. Затем планшеты блокировали ФСБ, содержащим 4% обезжиренного молока, в течение 2 часов при КТ, с последующим 4-кратным промыванием ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20. Образцы, собранные в ходе экспериментов с транцитозом добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при КТ перед промыванием согласно описанию выше. Захваченные варианты антител, IFX или общий IgG детектировали с применением конъюгированного с щелочной фосфатазой (ALP) Fc-специфическим антителом козы против антител человека. Связывание визуализировали путем добавления 100 мкл ALP-субстрата и регистрировали спектр поглощения при 405 нм. Транспортируемое количество вариантов антител, IFX и общего IgG вычисляли на основании стандартных кривых для каждого из индивидуальных вариантов антител.

Транцитоз вариантов антител через поляризованные эпителиальные клетки человека.

Результаты.

Тестировали транцитоз сконструированных вариантов антител против ФНО- α через монослой клеток и сравнивали с антителом дикого типа или IFX в качестве другого антитела IgG1 человека против ФНО- α . Результаты приведены на фиг. 2. Происходил транспорт антитела против ФНО- α дикого типа от апикального к базолатеральному резервуару. По сравнению с IFX, другим антителом IgG1 с Fc-областью дикого типа, происходил транспорт в 2,8 раз большего количества Ab-REW; то же наблюдалось и для Ab-REW-2FF.

Транцитоз вариантов антител через поляризованные эпителиальные клетки человека в присутствии конкурирующих IgG

Результаты.

Общее количество иммуноглобулина, транспортируемого через монослой поляризованных клеток T84 от апикального к базолатеральному резервуару, при инкубации вариантов антител против ФНО- α с 10-кратным избытком белка IgG-миеломы человека, было сопоставимым для всех антител через 4 часа после добавления. Тем не менее, повышенная аффинность в отношении FcRn при pH 6,0 приводила к значимо более высокому проценту транспорта специфического антитела против ФНО- α через монослой клеток также в присутствии избытка конкурирующего IgG человека с нерелевантной специфичностью. Результаты представлены на фиг. 3.

Пример 6. АЗКЦ.

Способ.

Использовали основной набор для репортерного биологического анализа АЗКЦ от Promega. Вкратце, целевые клетки мФНО- α CHO-K1 с плотностью 1×10^5 /мл высевали в белые (с прозрачным дном) планшеты для тканевых культур в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На 2 день удаляли 95 мкл среды для анализа и заменяли на 25 мкл сконструированных эффекторных клеток Jurkat с плотностью 3×10^6 /мл. Затем планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C/5% CO₂. Реагент BioGlo™ готовили в конце инкубации. Планшеты уравнивали до достижения КТ в течение 10-20 мин перед добавлением 75 мкл реагента BioGlo™ на лунку. Через 5-10 мин инкубации в темноте измеряли люминесценцию. Для аппроксимации данных использовали модель 4-PL.

Результаты.

Результаты (см. фиг. 4) показали, что все указанные антитела против ФНО- α индуцировали АЗКЦ, но с разной силой. По сравнению с антителом дикого типа Ab-wt указанные варианты антител продемонстрировали повышенную АЗКЦ. В частности, нефукозилированный вариант антитела Ab-REW-2FF отличался значимо улучшенной АЗКЦ.

Пример 7. Связывание C1q.

Способ.

ИФА ELISA проводили с использованием 96-луночных планшетов MaxiSorp; лунки были покрыты ФНО- α человека, разведенным в ФСБ до 1 мкг/мл. После инкубации в течение ночи при 4°C планшеты блокировали ФСБ, содержащим 4% обезжиренного молока, в течение 1 часа и четыре раза промывали ФСБ, содержащим 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т). Затем титрованные растворы антител IgG против ФНО- α разводили в ФСБ-Т, добавляли и инкубировали в течение 1 часа при КТ. После промывания ФСБ-Т в лунки добавляли C1q человека (0,5 мкг/мл), разведенный в 0,1 М вероналовом буфере (0,25 mM CaCl₂ и 0,8 mM MgCl₂, pH 7,2), и инкубировали в течение 1 часа. Затем лунки промывали согласно описанию выше, после чего добавляли в лунки антитело кролика против C1q человека, разведенное 1:5000 в ФСБ-Т, и инкубировали в течение 1 часа. После промывания добавляли конъюгированные с HRP антитела осла против IgG кролика, разведенные 1:5000 в ФСБ-Т. Затем лунки промывали и добавляли в каждую лунку по 100 мкл 3,3',5,5'- субстрат тетраметилбензидина. Измеряли поглощение при 620 нм с использованием спектрофотометра Sunrise.

Результаты.

Варианты антител против ФНО- α захватывали на ФНО- α человека до добавления C1q человека. Ре-

зультаты (см. фиг. 5) показали, что указанные антитела связывались с C1q, но с разной силой связывания. В частности, Ab-REW и Ab-REW-2FF связывались с несколько большей силой по сравнению с IFX. Присутствие фукозы на биантеннарном N-гликоне, присоединенном к N297, не оказывало влияния или оказывало только незначительное влияние на связывание. Иерархия связывания от самого сильного до самого слабого выглядела следующим образом: Ab-REW > Ab-REW-2FF > IFX.

Пример 8. КЗЦ.

Способ.

В анализе КЗЦ против ФНО- α измеряли антителозависимую цитотоксичность комплемента кролика. Целевые клетки, экспрессирующие мФНО- α , высевали в микропланшеты в присутствии антител против ФНО- α , стимулирующих цитотоксический потенциал комплемента. Получали шесть независимых репликатов образцов (варианты антител против ФНО- α) и 4 репликата референсного стандарта (IFX) в концентрации 60 мкг/мл, готовили серийные разведения (1,3-кратное разведение) и герметизировали планшеты с разведениями до применения. Плотность целевых клеток, содержащих LUC-репортер для определения жизнеспособности, доводили до $1,5 \times 10^5$ /мл, и держали клетки на водяной бане при 37°C. Комплемент кролика разводили до 3-кратной конечной аналитической концентрации в DMEM с высоким содержанием глюкозы. Непосредственно после получения комплемент комбинировали с целевыми клетками в соотношении 1:1 (по объему). По 40 мкл состава с комплементом/целевыми клетками переносили в каждую лунку аналитического планшета. Полученные антитела в планшете для разведений переносили в клетки (20 мкл/лунку) и затем планшет инкубировали при 36°C/1% CO₂ в течение 3,5 часов. Аналитические планшеты уравнивали до достижения КТ в темноте в течение 35 минут. Набор Steady Glo, который уравнивали до достижения температуры окружающей среды в течение 120 минут до применения, добавляли в аналитический планшет (20 мкл/лунку) и хранили при КТ в темноте в течение 35 минут до измерения люминесценции. Затем для каждой концентрации каждого образца рассчитывали процент гибели клеток и использовали модель 4-PL для аппроксимации данных.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 6 и в табл. 7. Показатели относительной EC₅₀ и относительного максимального % гибели для тестируемого образца в анализе КЗЦ обеспечивали четкое ранжирование активности, согласующееся по обоим критериям активности. Ab-REW демонстрировало более высокую КЗЦ-активность, чем IFX, независимо от содержания фукозы. При прямом сравнении образцов варианта с фукозой для лучшего понимания влияния содержания фукозы на КЗЦ-активность Ab-REW-2FF, по сравнению с Ab-REW, обеспечивало ответы с аналогичной КЗЦ-активностью. В указанном сравнении продемонстрированы относительная EC₅₀, равная 97,1%, и относительный максимальный % гибели, равный 100,4%.

Таблица 7

Сравнение КЗЦ-активности вариантов антител против ФНО- α и IFX, исходя из показателей относительной EC₅₀ и относительного % гибели

ID образца	Относительная EC ₅₀ (%)	Относительная максимальная гибель (%)
IFX	100	100
Ab-REW	123,7	113,8
Ab-REW-2FF	120,1	114,2

Пример 9. Индукция регуляторных макрофагов.

Способ.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из нормальных лейкоцитомоноцитарных слоев. Клетки выделяли центрифугированием в градиенте фиколла. Клетки от двух индивидуальных доноров смешивали в равных долях, и 2×10^5 клеток указанной смеси высевали в 96-луночные планшеты в общем объеме 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C/5% CO₂. Через 48 часов добавляли варианты антител против ФНО- α или IFX до конечной концентрации 10 мкг/мл. Каждое соединение добавляли в пяти или шести репликатах. Итоговый объем составлял 150 мкл/лунку. IgG1 сыворотки человека (Sigma #15154) использовали в качестве контроля. После добавления соединений проводили культивирование для реакций смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ) в течение еще 4 дней при 37°C/5% CO₂. После этого планшеты промывали с применением ФСБ/5 мМ ЭДТК (ФСБ/ЭДТК) и инкубировали с 50 мкл/лунку ФСБ/ ЭДТК в течение 20 минут при КТ. Планшеты центрифугировали и удаляли жидкость. Антитело разводили в ФСБ/ЭДТК (антитело против CD14-PE, антитело против CD206-APC, разведенные 1:10). Клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора антитела и инкубировали в течение 20 минут при КТ. После этого клетки промывали ФСБ/ЭДТК и ресуспендировали в 50 мкл ФСБ/ЭДТК. Окрашенные образцы анализировали на FACS Fortessa с использованием программного обеспечения FACSDiva. Анализ проводили с использованием программного обеспечения FlowJo.

Результаты.

Индукцию регуляторных макрофагов анализировали в ходе четырех независимых РСКЛ; она была успешной во всех экспериментах (сравнение IFX с контрольным IgG). Результаты показаны на фиг. 7. Уровни индукции IFX в разных экспериментах могут различаться из-за того, что в каждом эксперименте были задействованы разные доноры с межиндивидуальной вариабельностью. Все протестированные варианты антител против ФНО- α индуцировали регуляторные макрофаги CD14 CD206 с незначительными вариациями между соединениями. Ab-REW и Ab-REW-2FF индуцировали несколько большее количество регуляторных макрофагов по сравнению с IFX, однако только в случае Ab-REW-2FF указанное увеличение было значимым.

Пример 10. Ингибирование пролиферации Т-клеток.

Способ.

МКПК выделяли из нормальных лейкоцитомоноцитарных слоев. Клетки выделяли центрифугированием в градиенте фиколла. Клетки от двух индивидуальных доноров смешивали в равных долях, и 2×10^5 клеток указанной смеси высевали в 96-луночные планшеты в общем объеме 100 мкл/луночку. Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C/5% CO₂. Через 48 часов добавляли варианты антител против ФНО- α или IFX до конечной концентрации 10 мкг/мл. Каждое соединение добавляли в пяти или шести репликатах. Итоговый объем составлял 150 мкл/луночку. IgG1 сыворотки человека (Sigma #15154) использовали в качестве контроля. После добавления соединений проводили культивирование для реакций смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ) в течение еще 2 дней при 37°C/5% CO₂. После этого в культуры добавляли тритий-меченый тимидин (³H тимидин, 0,5 мКи/луночку). Культуры дополнительно инкубировали в течение 18 часов при 37°C/5% CO₂. Образцы собирали с использованием коллектора клеток Microbeta FilterMat 96 и анализировали с применением счетчика для микропланшетов Microbeta, оснащенного одним детектором. Подсчет в образцах проводили в течение 10 секунд/луночку и преобразовывали результат в число импульсов в минуту (cpm).

Результаты.

Ингибирование пролиферации Т-клеток измеряли в ходе трех независимых РСКЛ и определяли как успешное, если IFX в качестве положительного контроля индуцировал подавление. Уровни подавления IFX в индивидуальных экспериментах могут различаться, предположительно в результате вариабельности индукции регуляторных макрофагов. В каждом эксперименте рассчитывали потенциал подавления пролиферации Т-клеток вариантами антител против ФНО- α относительно положительного контроля, IFX. Антитело Ab-REW-2FF продемонстрировало значимо усиленное подавление по сравнению с IFX, тогда как подавление антителом Ab-REW было сопоставимо с обеспечиваемым IFX (см. фиг. 8).

Пример 11. Анализ N-гликанов.

Способ.

50 мкл каждого варианта IgG (1 мг/мл) осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 13000×g, затем добавляли 1 мкг трипсина, растворенного в 100 мкл 50 мМ бикарбоната аммония (pH 7,8) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Устройства для центрифугирования запускали на 10 мин при 13000×g, переносили проточную фракцию в пробирку Эппендорфа и высушивали в аппарате SpeedVac (Heto Maxi Dry). Высушенные образцы растворяли в 20 мкл 1% муравьиной кислоты, обрабатывали ультразвуком в течение 30 секунд и центрифугировали в течение 10 мин при 16100×g. Затем каждый образец переносили в новый сосуд, и проводили анализ протеолитических пептидов методом наножидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) в реальном времени с обращенной фазой (C18) с применением систем для УВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). 5 мкл раствора пептидов вводили в экстракционную колонку и пептиды элюировали в режиме обратной промывки из экстракционной колонки в аналитическую колонку. Подвижная фаза состоит из ацетонитрила и воды масс-спектрометрического качества, которые содержат 0,1% муравьиной кислоты. Хроматографическое разделение осуществляли с использованием бинарного градиента ацетонитрила от 3 до 50 % в воде в течение 60 минут со скоростью потока 0,3 мкл/мин. ЖХ-систему сопряжали через наноэлектрораспылительный источник ионов с масс-спектрометром Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы пептидов анализировали с применением способа фрагментации с высокоэнергетической столкновительной диссоциацией (HCD-фрагментации) с нормированной энергией столкновения 20%, проводя одно обзорное сканирование Orbitrap в диапазоне масс м/з 300-2000 с последующим МС/МС десяти наиболее интенсивных ионов в Orbitrap.

Анализ данных проводили на Xcalibur v2.0. Спектры МС/МС для всех N-гликопептидов экстрагировали методом поиска ионов оксония; 204.086 (N-ацетилгексозамин) и 366.1388 (N-ацетилгексозамин-гексоза). С применением HCD-фрагментации с нормированной энергией столкновения 20% детектировали структуру гликана и массу пептида IgG. Экстрагированные ионные хроматограммы для целевых гликоль-пептидов (EEQYNSTYR для IgG1) экстрагировали с точностью 10 ppm и соответствующие спектры МС/МС верифицировали в ручном режиме. HCD-фрагментацию с нормированной энергией столкновения 35% использовали для детекции последовательности пептида и для верификации того, что масса пептида соответствует корректной последовательности пептида. Рассчитывали площадь под кривой для всех экстрагированных гликоль-пептидов и определяли процентное соотношение для каждой гликоформы.

Результаты.

В Ab-REW преобладали две формы N-гликана, соответствующие > 90% общего пула N-гликанов, а именно, 4GlcNac-1Fuc-3Man и 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal. Обе преобладающие формы N-гликанов содержали коровую фукозу. Для получения "нефукозилированного" варианта Ab-REW (Ab-REW-2FF) использовали субстрат-ловушку 2-деокси-2-фтор-1-фукозу (2FF). МС-картирование указанного антитела показало, что указанная стратегия успешно обеспечивала значительное снижение включения фукозы, поскольку было детектировано падение с > 90% до 13%. После обработки преобладали те же самые формы N-гликанов, что и во вариантах, полученных в отсутствие 2FF, за исключением того, что в указанных структурах отсутствовала фукоза (см. также фиг. 10).

Таблица 8

Процент форм N-гликанов, присоединяемых к N297 антител IgG против ФНО- α		
Структура N-гликана	Ab-REW (%)	Ab-REW-2FF (%)
4GlcNac-1Fuc-3Man	69,1	8,5
4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal	21,7	4,5
4GlcNac-3Man	0,7	64,3
4GlcNac-3Man-1Gal	0	17,3
Другие паттерны гликозилирования	8,5	5,4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее связывающий ФНО- α домен и сайт связывания FcRn, обладающее высокой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 6,0, причем указанная высокая аффинность характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D) меньше 100 нМ, и дополнительно характеризующийся отсутствием или низкой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 7,4, причем указанная низкая аффинность характеризуется K_D больше 10 мкМ, причем аминокислотная последовательность указанного антитела содержит аминокислоты 311R (согласно нумерации EU), 428E (согласно нумерации EU) и 434W (согласно нумерации EU), причем антитело содержит: (i) V_L домена, содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и (ii) V_H домен, содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

2. Антитело по п.1, обладающее более высокой аффинностью в отношении FcRn человека при pH 6,0, чем инфликсимаб.

3. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанная высокая аффинность в отношении FcRn человека при pH 6,0 характеризуется константой диссоциации K_D меньше 10 нМ.

4. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО- α человека с K_D меньше 100 пМ.

5. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое транспортируется через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в большем количестве, чем инфликсимаб.

6. Антитело по п.5, характеризующееся тем, что количество антитела, транспортируемого через указанный монослой поляризованных клеток, более чем в два раза превышает количество инфликсимаба, транспортируемое через указанный монослой поляризованных клеток.

7. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что через монослой поляризованных клеток от апикальной стороны к базолатеральной стороне в присутствии десятикратного избытка конкурирующих иммуноглобулинов транспортируется более высокий процент указанного антитела, чем процент инфликсимаба, причем процент относится к общей массе иммуноглобулинов, транспортируемых через монослой поляризованных клеток.

8. Антитело по п.7, характеризующееся тем, что процент указанного антитела, транспортируемый через указанный монослой поляризованных клеток более чем в три раза выше процента инфликсимаба, транспортируемого через указанный монослой поляризованных клеток.

9. Антитело по любому из предшествующих пунктов, представляющее собой нефукозилированное антитело или антитело с пониженным фукозилированием.

10. Применение антитела, определенного в любом из предшествующих пунктов, для лечения воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта.

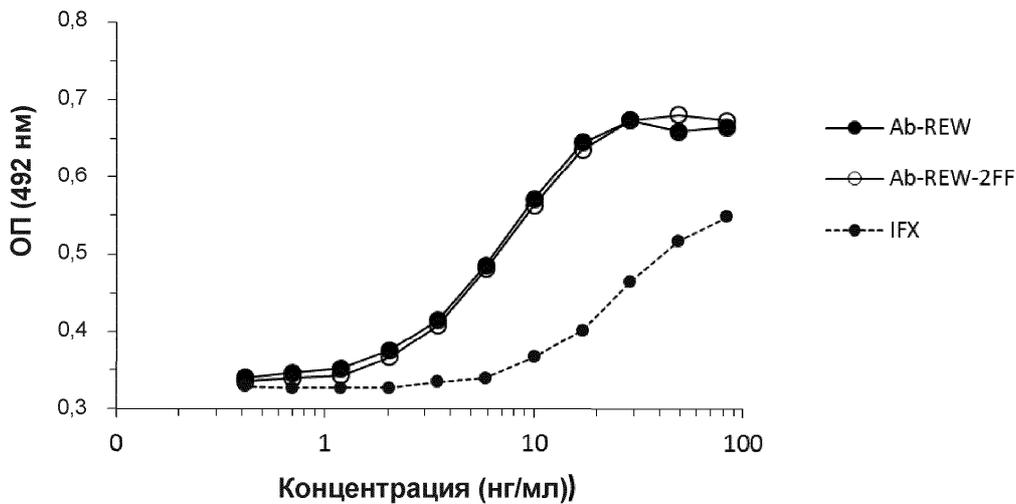
11. Применение антитела по п.10, характеризующееся тем, что указанное лечение включает пероральное введение эффективного количества указанного антитела.

12. Применение антитела по п.10, характеризующееся тем, что указанное антитело применяют местно.

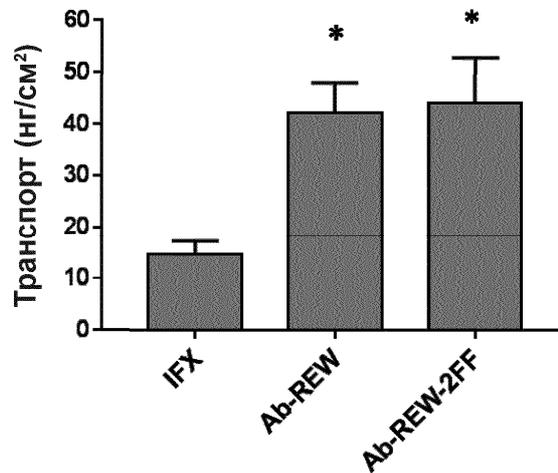
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ улучшения трансцитоза антитела, направленного против ФНО- α , включающий введение замен Q311R (согласно нумерации EU), M428E (согласно нумерации EU) и N434W (согласно нумерации EU) в последовательность аминокислот указанного антитела.

15. Способ увеличения времени полужизни в плазме антитела, направленного против ФНО- α , включающий введение замен Q311R (согласно нумерации EU), M428E (согласно нумерации EU) и N434W (согласно нумерации EU) в последовательность аминокислот указанного антитела.

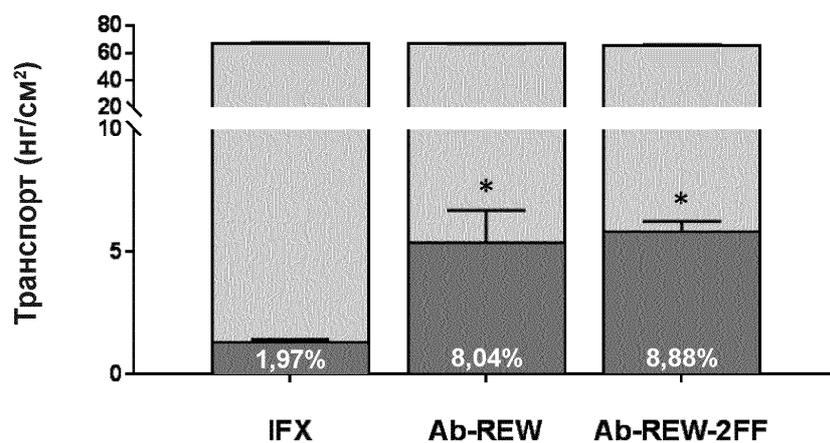


Фиг. 1

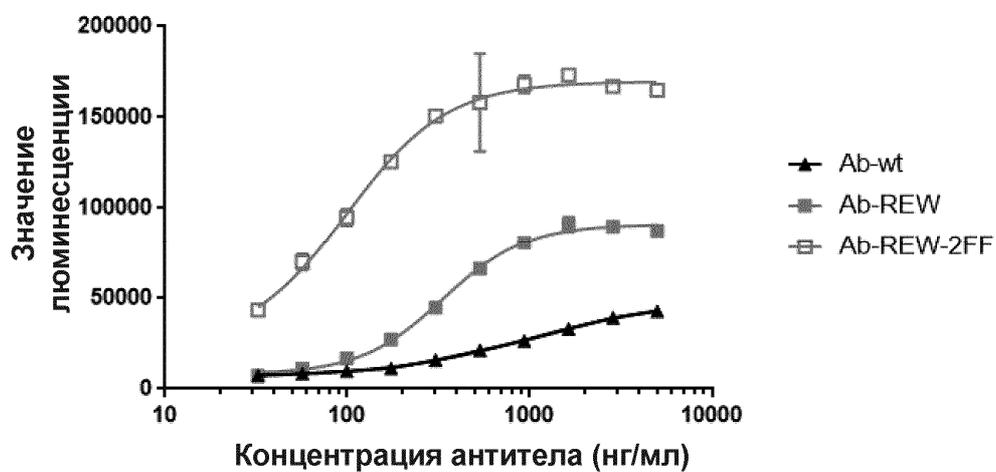


Фиг. 2

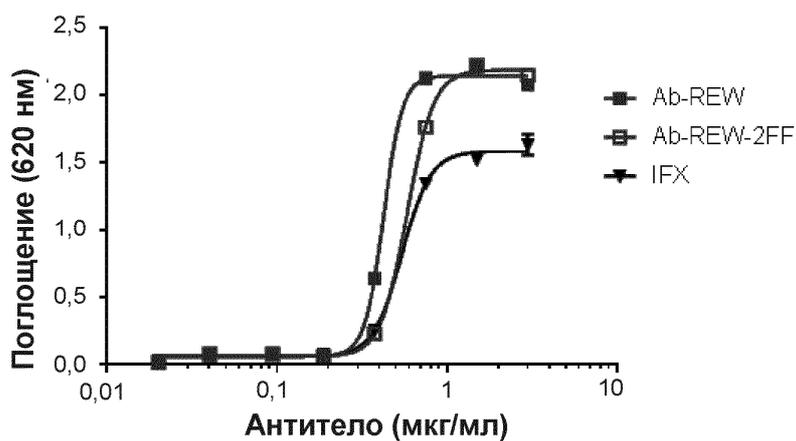
Общий IgG



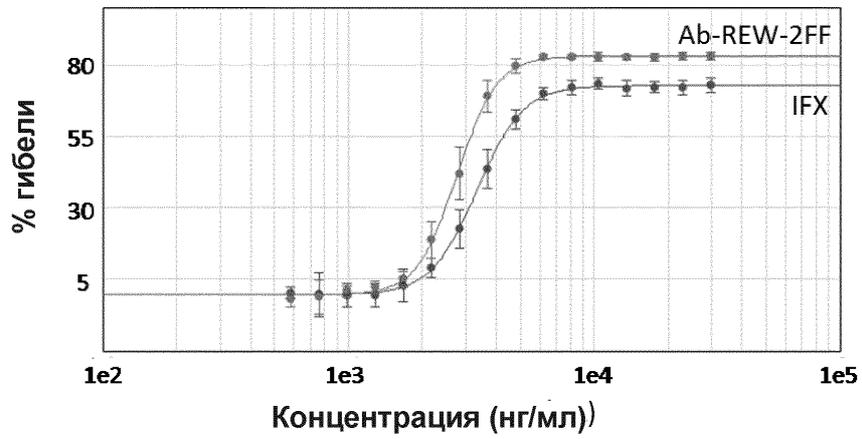
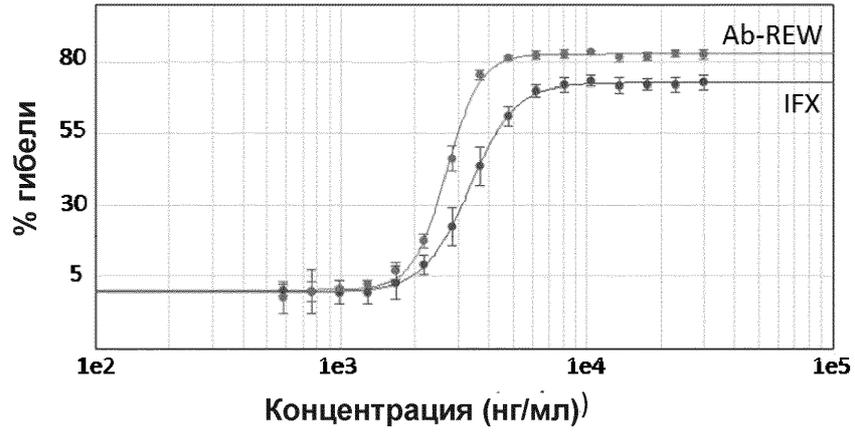
Фиг. 3



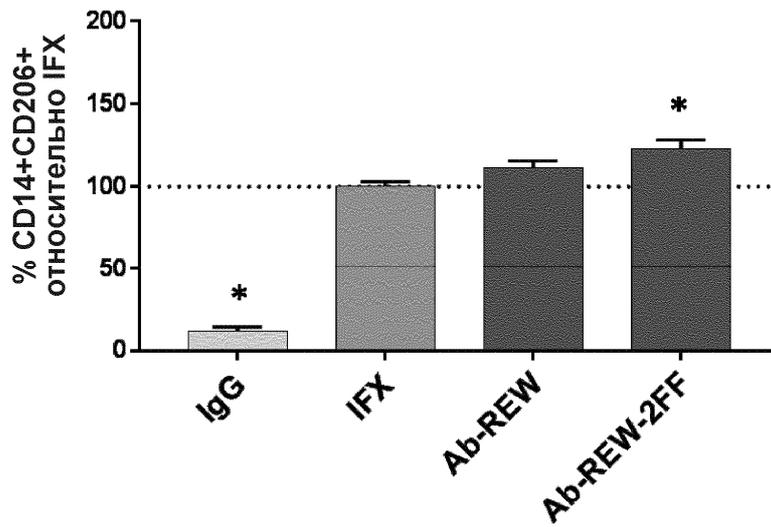
Фиг. 4



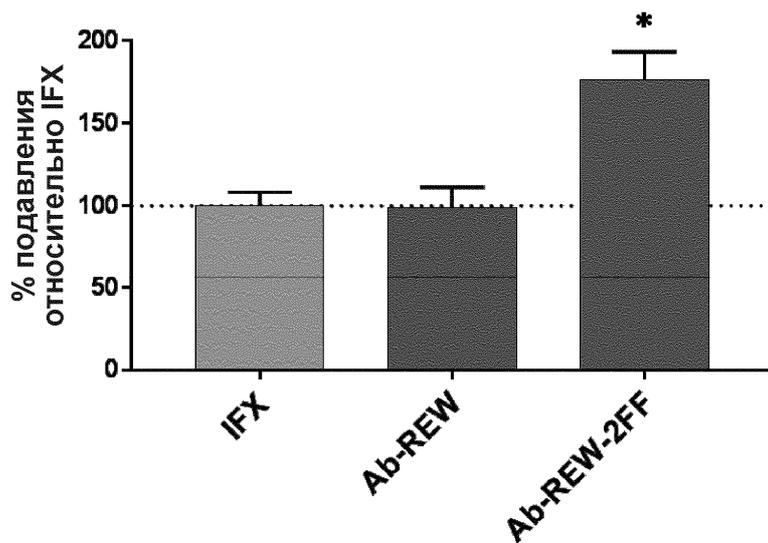
Фиг. 5



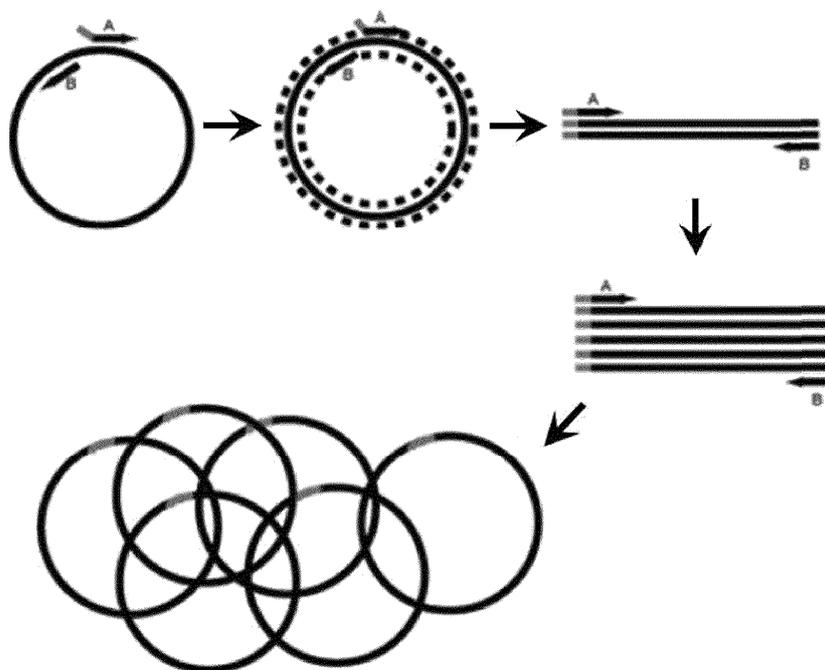
Фиг. 6



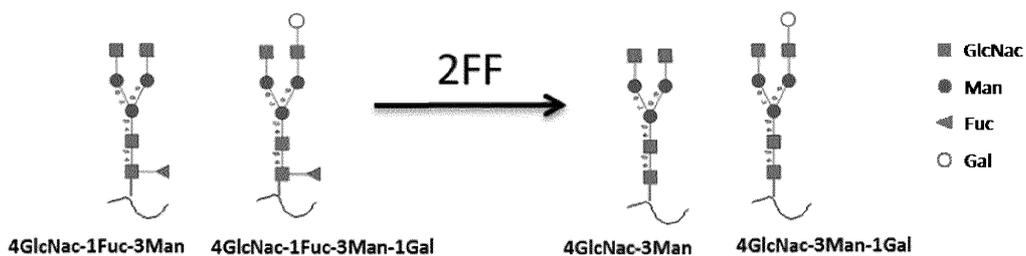
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

