

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047177**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.06.17**

(21) Номер заявки  
**202192810**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.06.10**

(51) Int. Cl. **A61K 39/40** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К PcrV, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ PcrV, КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА К PcrV, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/860,146**

(32) **2019.06.11**

(33) **US**

(43) **2022.03.05**

(86) **PCT/US2020/037008**

(87) **WO 2020/252029 2020.12.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Кирагсоус Кристос, Коппи Алида (US)**

(74) Представитель:  
**Джермакян Р.В., Прищепный С.В.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.  
(RU)**

(56) **WO-A2-2014074528  
EP-A1-2407537  
WO-A1-2017095744**

---

(57) В настоящем изобретении предусмотрены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с PcrV *Pseudomonas aeruginosa*, а также способы их применения. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают PcrV. Антитела к PcrV и антигенсвязывающие фрагменты являются применимыми для предупреждения и лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

---

**047177**

**B1**

**047177**

**B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

В настоящем изобретении частично предусмотрены антитела, биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают PcrV, а также композиции и способы лечения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

### **Перечень последовательностей**

Официальная копия перечня последовательностей подается одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием "10494WO01\_SEQ\_LIST\_ST25.txt", дата создания 10 июня 2020 года, и размером приблизительно 76 Кб. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Предпосылки изобретения**

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) представляет собой грамотрицательную палочковидную бактерию, присутствующую в самых разных средах. Нуждаясь только в простом питании, *P. aeruginosa* может расти в дистиллированной воде и может хорошо расти в средах с ацетатом и средах с сульфатом аммония. Она может расти при температуре до 42°C и является устойчивой к высоким концентрациям солей, антисептиков слабого действия и многих антибиотиков.

Являясь оппортунистическим патогеном, эти бактерии представляют серьезную проблему для здоровья, часто являясь устойчивыми к лекарственным средствам и вызывают внебольничные и внутрибольничные инфекции. Такие бактериальные инфекции могут быть серьезными и опасными для жизни, при этом пневмония является одним из наиболее серьезных проявлений. Бактерия редко вызывает заболевание у здоровых людей и животных, но представляет серьезную проблему для тяжелобольных или людей с ослабленным иммунитетом. Например, инфекция, вызванная *P. aeruginosa*, является серьезной проблемой для людей с муковисцидозом (CF), приводящей к прогрессирующему повреждению легких в результате рецидивирующих и хронических инфекций дыхательных путей, вызванных данной бактерией. К другим группам риска относятся пациенты, подключенные к аппаратам искусственной вентиляции легких, пациенты с туберкулезом, пациенты с нейтропеническим злокачественным новообразованием и индивидуумы, перенесшие ожоговую травму.

Бактериальная система секреции типа 3 (T3SS) является важным фактором вирулентности грамотрицательных бактерий. T3SS представляет собой сложную мультибелковую структуру, полностью пронизывающую клеточную стенку бактерии. Антителам доступны только два белка: одноцилиндровый белок, образующий гомополимер, и белок кончика иглы. Белок кончика иглы V *P. aeruginosa* (PcrV) представляет собой пример белка кончика иглы V, встречающегося у многих грамотрицательных бактериальных T3SS. PcrV расположен на конце белка T3SS, образуя пентамерную структуру кольцевого типа на кончике иглы.

Полая игльчатоподобная молекулярная структура T3SS действует путем перемещения токсинов (EcoS, EcoT, EcoU и EcoY) в эукариотические клетки, вызывая гибель и лизис клеток. Однако самой поры транслокации достаточно, чтобы вызвать гибель инфицированных клеток либо непосредственно путем опосредованного порами увеличения проницаемости мембраны, либо косвенно путем активации широкого спектра клеточных защитных ответов. Посредством уничтожения лейкоцитов и эпителиальных клеток и обуславливания воспаления механизм вирулентности T3SS дает возможность *P. aeruginosa* избежать иммунной защиты человека.

Остается значительная неудовлетворенная медицинская потребность в улучшенных лекарственных средствах, относящихся к антибиотикам, которые позволяют лечить или предупреждать инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*.

### **Краткое описание**

В данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают белок кончика иглы V *P. aeruginosa* (PcrV). Такие антитела применимы для ингибирования или нейтрализации активности бактериальной системы секреции типа 3 (T3SS) у *P. aeruginosa*. В некоторых вариантах осуществления антитела применимы для блокирования транслокации токсинов от бактерий к клетке-хозяину и/или для предотвращения гибели клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления функция антител проявляется в блокировании опосредованной порами проницаемости мембраны в клетке-хозяине.

В определенных вариантах осуществления антитела применяют в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитела можно вводить с профилактической или терапевтической целью пациенту, имеющему инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, или подверженному риску ее возникновения. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить пациенту, имеющему инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить пациенту, подверженному риску возникновения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, например пациенту с муковисцидозом, диабетом, подключенному к аппарату искусственной вентиляции легких, подвергающемуся операции, с туберкулезом, с ВИЧ, с

ослабленной иммунной системой, с нейтропенией, с постоянным катетером, после физической травмы, с ожогами, в отделении интенсивной терапии, прикованному к постели, со злокачественными новообразованиями, с хронической обструктивной болезнью легких, в лечебном учреждении с долгосрочным уходом, или человеку, употребляющему наркотики внутривенным путем.

Антитела, предусмотренные в данном документе, могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- или scFv-фрагмент), и могут быть модифицированы с обеспечением эффекта в отношении функциональности, например для увеличения стабильности в хозяине или с обеспечением устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В определенных вариантах осуществления антитело может быть биспецифическим.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PcrV. Такие антитела часто являются функциональными антагонистами T3SS, т. е. антитела связываются с PcrV и ингибируют T3SS.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PcrV, где антитело имеет одну или более из следующих характеристик:

(a) содержат три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34 и 50; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42 и 58;

(b) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(c) связываются с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(d) связываются с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;

(e) демонстрируют нейтрализацию штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно  $10^{-8}$  М в анализе цитотоксичности;

(f) демонстрируют нейтрализацию штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе цитотоксичности;

(g) демонстрируют нейтрализацию штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М в анализе бляшкообразования;

(h) демонстрируют нейтрализацию штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе бляшкообразования;

(i) снижают смертность от штамма 6206 или штамма 6077 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 5 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

(j) снижают смертность от штамма 6206 или штамма 6077 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 1,0, 0,2 или 0,04 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

(k) снижают бактериальную нагрузку в легких штамма 6206 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 0,1 мг/кг или 0,2 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

(l) снижают бактериальную нагрузку в легких штамма PA01 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 25 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии; и/или

(m) перекрестно конкурируют с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1.

В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно обладают одной или более из следующих характеристик:

(n) связываются с полноразмерным PcrV (SEQ ID NO: 77) с  $EC_{50}$  менее приблизительно  $10^{-8}$  М;

(o) связываются с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81) с  $EC_{50}$  менее приблизительно  $10^{-8}$  М;

(p) взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (i) аминокислотных остатков от положения приблизительно 150 до положения приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и из (ii) аминокислотных остатков от положения приблизительно 155 до положения приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и/или

(q) взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86.

Иллюстративные антитела к PcrV, предусмотренные в данном документе, перечислены в табл. 1, 2 и 3 в данном документе. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей

вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к PcrV. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к PcrV. В табл. 3 представлены последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот тяжелой и легкой цепей нескольких иллюстративных антител.

В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34 и 50.

Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42 и 58.

В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к PcrV, перечисленных в табл. 1.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42 и 50/58.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36 и 52;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38 и 54;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40 и 56;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44 и 60;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46 и 62 и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48 и 64.

В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (H1H29329P), 18/26 (H1H29332P), 34/42 (H1H29336P) и 50/58 (H1H29339P).

В данном документе также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

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

В данном документе также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, вы-

бранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или по сути аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к ней.

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

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

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

В данном документе также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к PcrV, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (H1H29329P), 18/26 (H1H29332P), 34/42 (H1H29336P) и 50/58 (H1H29339P).

В данном документе также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к PcrV, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, H1H29329P), 20-22-24-28-30-32 (например, H1H29332P); 36-38-40-44-46-48 (например, H1H29336P); и 52-54-56-60-62-64 (например, H1H29339P).

В связанном варианте осуществления в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных для любого из иллюстративных антител к PcrV, перечисленных в табл. 1. Например, в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H29329P), 18/26 (например, H1H29332P), 34/42 (например, H1H29336P) или SEQ ID NO: 50/58 (например, H1H29339P). Способы и методики идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут применяться для идентификации CDR в пределах указанных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Иллюстративные общепринятые способы, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариативности последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении структурных областей петли, а определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

В данном документе также предусмотрены антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, представленных в табл. 3, и/или любую одну из аминокислотных последовательностей легкой цепи, представленных в табл. 3.

В данном документе предусмотрены антитела, которые содержат HC, содержащую аминокислот-

ную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в табл. 3, или фактически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

Также предусмотрены антитела, которые содержат LC, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в табл. 3, или фактически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

В данном документе предусмотрены антитела, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC и LC (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в табл. 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в табл. 3. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC/LC, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к PcrV, перечисленных в табл. 3.

В одном варианте осуществления выделенное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HC/LC, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65/66, 67/68, 69/70 или 71/72.

Настоящее изобретение включает антитела к PcrV, характеризующиеся модифицированным паттерном гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например для увеличения функционального свойства антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В данном документе также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с PcrV *P. aeruginosa* с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая HCVR и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81) с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Дополнительно предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают тот же эпитоп PcrV *P. aeruginosa*, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая HCVR и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81), или остатки PcrV 150-170 (SEQ ID NO: 86), или остатки PcrV 155-170 (SEQ ID NO: 85).

Также дополнительно предусмотрены выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют транслокацию токсинов посредством PcrV *P. aeruginosa* от бактерий к клетке-хозяину. Также дополнительно предусмотрены выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют увеличение проницаемости мембран клетки-хозяина, опосредованное порами, образованными T3SS.

В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими и характеризуются первой специфичностью связывания с первым эпитопом в белке PcrV и второй специфичностью связывания со вторым эпитопом в белке PcrV, где первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися. В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать первое плечо, которое связывается с эпитопом в белке PcrV, и второе плечо, которое связывается с другим антигеном *P. aeruginosa*.

В другом аспекте в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к PcrV или их части. Например, в настоящем изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.

Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении нее.



определенных вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR получены из одного и того же антитела к PcrV, приведенного в табл. 1.

Также в данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в табл. 1. В настоящем изобретении также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в табл. 1.

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

В другом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более выделенных моноклональных антител человека или их фрагменты, которые специфически связываются с PcrV, как раскрыто в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Одно или более выделенных антител могут содержать CDR в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. Одно или более выделенных антител могут содержать пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую последовательности HCVR и LCVR, перечисленные в табл. 1. В одном варианте осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42 и 50/58. В одном варианте осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34/42 и 50/58.

В другом родственном аспекте в данном документе предусмотрена композиция, которая представляет собой комбинацию антитела к PcrV и одного или более дополнительных терапевтических средств.

В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к PcrV обеспечивается преимущество. Иллюстративные средства, которые можно преимущественно объединять с антителом к PcrV, включают без ограничения другие средства, которые связывают и/или подавляют активность *P. aeruginosa* (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые не связывают непосредственно PcrV или другой антиген *P. aeruginosa*, но тем не менее подавляют активность бактерии, в том числе способность инфицировать клетки-хозяева. В некоторых аспектах второе терапевтическое средство может представлять собой терапевтическое средство для лечения инфекций, связанных с другим организмом, который может осуществлять инфицирование совместно с *P. aeruginosa*, например таким организмом, как *S. aureus*. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из антибиотика, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела к *P. aeruginosa* и терапевтического средства, применимого для лечения совместной инфекции. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство применимо для лечения совместной инфекции с *S. aureus*.

В родственном аспекте в данном документе предусмотрен способ нейтрализации *P. aeruginosa*, при этом способ включает подвергание клетки, содержащей внутриклеточную *P. aeruginosa*, воздействию композиции, содержащей одно или более антител к PcrV или их антигенсвязывающих фрагментов, где воздействие приводит к усиленной защите от гибели клеток. В определенных вариантах осуществления воздействие может происходить *in vitro* или *in vivo*. В определенных вариантах осуществления усиленная защита наблюдается, если антитело используют отдельно или если его используют в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или антителами к *P. aeruginosa*. В определенных вариантах осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из антибиотика, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела к *P. aeruginosa* и терапевтического средства, применимого для лечения совместной инфекции. В некоторых аспектах одно или более дополнительных терапевтических средств представляют собой терапевтическое средство, применимое для лечения совместной инфекции, такой как инфекция, вызванная *S. aureus*. В некоторых аспектах одно или более дополнительных терапевтических средств представляют собой другое антитело к *P. aeruginosa*.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы снижения риска заражения инфекцией *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах способ включает введение одного или более антител к PcrV, предусмотренных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей одно или более антител к PcrV. Пациент с большим риском инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, может представлять собой пациента с муковисцидозом, диабетом, подключенного к аппарату искусст-

венной вентиляции легких, подвергающегося операции, с туберкулезом, с ВИЧ, с ослабленной иммунной системой, с нейтропенией, с постоянным катетером, после физической травмы, с ожогами, в отделении интенсивной терапии, прикованному к постели, со злокачественными новообразованиями, с хронической обструктивной болезнью легких, в лечебном учреждении с долгосрочным уходом, или человека, употребляющего наркотики внутривенным путем.

В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы снижения бактериальной нагрузки у субъекта. В определенных вариантах осуществления в легких субъекта наблюдается снижение бактериальной нагрузки. В некоторых аспектах способ включает введение субъекту композиции, содержащей одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают PcrV. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют доставку токсинов *P. aeruginosa* в клетку-хозяина. В некоторых аспектах лечение с помощью антитела к PcrV, предусмотренного в данном документе, снижает бактериальную нагрузку *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах лечение с помощью антитела к PcrV, предусмотренного в данном документе, снижает бактериальную нагрузку *P. aeruginosa* и бактериальную нагрузку *S. aureus*.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, или субъекта, подверженного риску инфицирования *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах способ включает введение по меньшей мере одного антитела к PcrV или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к PcrV, нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, или субъекта, подверженного риску инфицирования *P. Aeruginosa*, где субъект страдает муковисцидозом. В некоторых аспектах способ включает введение по меньшей мере одного антитела к PcrV или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к PcrV, субъекту. В некоторых аспектах у субъекта нет симптомов пневмонии на момент введения.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы облегчения или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, у субъекта. В некоторых аспектах способ включает введение одного или более антител к PcrV или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к PcrV или его антигенсвязывающий фрагмент, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, озноба, головной боли, усталости, боли в суставах, скованности, миалгии, диареи и рвоты; боли, зуда и выделения жидкости из ушей; высыпаний, включая заполненные гноем пустулы на коже; боли и покраснения глаз; пневмонии, кашля и заложенности носа; выделения зеленого гноя со сладким фруктовым запахом из мягких тканей; и инфекции мочевыводящих путей.

В некоторых аспектах субъект имеет пневмонию, бактериемию, инфекцию костей, инфекцию суставов, инфекцию кожи, ожоговую инфекцию, раневую инфекцию или любую их комбинацию, вызванную инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*.

В некоторых аспектах одно или более антител к PcrV или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренные в данном документе, или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело к PcrV или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят профилактически или терапевтически нуждающемуся в этом субъекту для лечения или предупреждения развития инвазивной инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

В одном варианте осуществления субъект, нуждающийся в этом, представляет собой субъекта с активной инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, или субъекта с риском заражения инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах субъект выбран из группы, состоящей из индивида с ослабленной иммунной системой, госпитализированного индивида, индивида, страдающего серьезным заболеванием, индивида, подвергающегося хирургической операции, индивида, подвергающегося инвазивной процедуре, пациента с травмой, человека, употребляющего наркотики внутривенным путем, индивида с тяжелыми ожогами, индивида, использующего дыхательный аппарат, индивида с катетером, индивида, подвергающегося химиотерапии, индивида с диабетом, индивида с муковисцидозом, индивида с ВИЧ, индивида с туберкулезом или индивида с любым другим патологическим состоянием, которое может ослабить иммунную систему. В некоторых аспектах субъект имеет инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах субъект имеет инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, и инфекцию, вызванную *S. aureus*. В некоторых аспектах субъект имеет инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, и совместную инфекцию с одним или более другими грамотрицательными или грамположительными возбудителями. В некоторых аспектах субъект имеет пневмонию, бактериемию, инфекцию костей, инфекцию суставов, инфекцию кожи, ожоговую инфекцию, раневую инфекцию или любую их комбинацию, вызванную инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах *P. aeruginosa* устойчива или частично устойчива к антибиотикам.

В одном варианте осуществления нуждающемуся в этом субъекту можно вводить по меньшей мере одно антитело к PcrV или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Одно или более дополнительных терапевтических средств могут быть выбраны из группы, состоящей из антибиотика, противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), другого антитела к *P. aeruginosa*, терапевтического средства, применимого для лечения совместной инфекции, такой как инфекция, вызванная *S. aureus*, и любого другого лекарственного средства или терапевтического препарата, известных в данной области техники, применимых для уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, или для снижения бактериальной нагрузки у пациента. В одном варианте осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств предусматривают одно или более антител к PcrV. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое способствует нейтрализации или снижению любого(ых) возможного(ых) побочного(ых) эффекта(ов), ассоциированного(ых) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, если такой(е) побочный(е) эффект(ы) должен(ы) возникать.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция можно вводить подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально или перорально.

В определенных вариантах осуществления одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту, у которого имеется инфекция, вызванная *P. aeruginosa*, или риск ее возникновения, или предрасположенность к ее развитию. Субъекты, подверженные риску, включают без ограничения индивида с ослабленной иммунной системой, госпитализированного индивида, индивида, страдающего серьезным заболеванием, индивида, подвергающегося хирургической операции или другой инвазивной процедуре, пациента с травмой, человека, употребляющего наркотики внутривенным путем, индивида с тяжелыми ожогами, индивида, использующего дыхательный аппарат, индивида с катетером, индивида, подвергающегося химиотерапии, индивида с туберкулезом, индивида с диабетом, индивида с муковисцидозом, индивида с ВИЧ или индивида с любым другим патологическим состоянием, которое может ослабить иммунную систему.

Настоящее изобретение также включает антитело к PcrV или его антигенсвязывающий фрагмент, как предусмотрено в данном документе, для использования при лечении субъекта, у которого имеется инфекция, вызванная *P. aeruginosa*, или риск ее возникновения, или для использования в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, связанного с инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*.

В данном документе предусмотрены инъекционные устройства (например, игла и шприц для подкожных инъекций, автоинъектор или предварительно заполненный шприц) или емкости (например, флакон), которые включают антитело к PcrV или его антигенсвязывающий фрагмент, как предусмотрено в данном документе (например, антитело, имеющее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42 и 50/58).

Дополнительно предусмотрены способы введения композиции субъекту (например, человеку), включающие стадию введения компонентов композиции в организм субъекта, например парентерально, например путем инъекции с применением устройства для инъекций. В одном варианте осуществления настоящего изобретения субъект страдает инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, или имеет риск заражения инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*.

Дополнительно предусмотрены способы получения композиции, содержащей антитело к PcrV (например, композиции, содержащей антитело, имеющее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42 и 50/58) и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предусмотрены способы получения устройства или емкости, которые содержат раскрытую в данном документе композицию, включающие введение компонентов комбинации в емкость или устройство.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

#### **Подробное описание**

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

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными

в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы.

#### Определения

Термин "антитело", используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. "молекул полного антитела"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V<sub>H</sub>") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи ("LCVR" или "V<sub>L</sub>") и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). Участки V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на участки гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественно или искусственно модифицированы. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе прямого сравнения двух или более CDR.

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

Остатки CDR, которые не вступают в контакт с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не требуются) среди участков CDR согласно Kabat, находящихся за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. При удалении CDR или его остатка(остатков), обычно происходит замена аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирическим путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрытые в данном документе полностью человеческие моноклональные антитела к PcrV могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR варибельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко определить посредством сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR мутированы с получением соответствующего(их) остатка(ов) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(их) остатка(ов) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначаются как "мутации зародышевой линии"). Специалист средней квалификации в данной области техники, исходя из раскрытых в данном документе последовательностей варибельных областей тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки из каркасного участка и/или CDR в доменах V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub> подвергнуты обратной мутации до остатков, присутствующих в первоначальной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергнуты обратной мутации до первоначальной последовательности зародышевой линии, например, только подвергнутые мутации остатки, присутствующие в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, присутствующие в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков из каркасного участка и/или CDR подвергнуты мутации до соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально было получено антитело). Кроме того, антитела, раскрытые в данном документе, могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных участках

и/или участках CDR, например, при этом определенные отдельные остатки подвергнуты мутации до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшение специфичности связывания, повышение аффинности связывания, улучшение или усиление биологических антагонистических или агонистических свойств (в случае необходимости), снижение иммуногенности и т.п. Настоящее изобретение охватывает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа.

Также в данном документе рассматриваются полностью человеческие моноклональные антитела к PcrV, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к PcrV, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

Предусматривается, что используемый в данном документе термин "человеческое антитело" включает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии человеческого иммуноглобулина (например, мутации, вводимые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*), например в CDR, и в частности CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего (например, мыши), привиты на FR последовательности человека. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у млекопитающего, не относящегося к человеку, или в клетках млекопитающего, не относящегося к человеку. Термин не подразумевает включение антител, выделенных от человека-субъекта или полученных в его организме.

Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам согласно настоящему изобретению, которые созданы, экспрессированы, выделены или получены с помощью технологий или способов, известных из уровня техники, таких как, например, технология рекомбинантной ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не относящегося к человеку (в том числе у трансгенных млекопитающих, не относящегося к человеку, например, трансгенных мышей), или в клеточной системе экспрессии (например, клетках CHO), или они выделены из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или ему подобный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать с помощью равновесной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М или меньше (например, меньшее значение  $K_D$  означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны из уровня техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Описанные в данном документе антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, которые специфически связываются с PcrV. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с PcrV P. aeguginosa и одним или более дополнительными антигенами P. aeguginosa, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями PcrV P. aeguginosa, тем не менее, считаются антителами, которые "специфически связываются", как используется в данном документе.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем mAb, которые характеризуются аффинностью связывания с PcrV, выраженной в виде  $K_D$ , составляющей по меньшей мере  $10^{-7}$  М; предпочтительно  $10^{-8}$  М; более предпочтительно  $10^{-9}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-10}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-11}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-12}$  М, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или ELISA с определением сродства в растворе.

Термин "медленная скорость диссоциации", "Koff" или "kd" означает диссоциацию комплекса антитела и PcrV при константе скорости  $1 \times 10^{-3}$  с<sup>-1</sup> или менее, предпочтительно  $1 \times 10^{-4}$  с<sup>-1</sup> или менее, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, кото-

рый специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с PcrV.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд, или терапевтической молекулой ("иммуноконъюгат"), такой как антибиотик, второе антитело к *P. aeruginosa* или любая другая терапевтическая молекула, применимая в лечении инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

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

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

"Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" или "ADCC" представляет собой механизм клеточноопосредованной иммунной защиты, посредством чего эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует клетку-мишень, поверхностные мембранные антигены которой связаны специфичными антителами, такими как те, которые описаны в данном документе. Таким образом, это является одним механизмом, посредством которого, например, антитело, специфичное по отношению к бактерии, может ограничивать распространение инфекции. Классическая ADCC опосредована естественными клетками-киллерами (NK-клетками), макрофагами, нейтрофилами и, в некоторых случаях, эозинофилами.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", используемый в данном документе, относится к оптическому феномену, который делает возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Используемый в данном документе термин "K<sub>D</sub>" предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

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

Термин "перекрестно конкурирует", используемый в данном документе, означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном и подавляют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию двух антител в обоих направлениях, т.е. первое антитело, которое связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с разными, но не перекрывающимися эпитопами таким образом, что связывание одного подавляет или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерического несоответствия. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью способов, извест-

ных из уровня техники, например, с помощью анализа в реальном времени с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии. Для определения того, конкурирует ли перекрестно тестовое антитело с эталонным антителом к PcrV по настоящему изобретению, эталонному антителу дают возможность связываться с белком PcrV в условиях насыщения. Затем оценивается способность тестируемого антитела связываться с белком PcrV. Если тестируемое антитело способно связываться с белком PcrV после насыщающего связывания с эталонным антителом к PcrV, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к PcrV. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком PcrV после насыщающего связывания с эталонным антителом к PcrV, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным антителом к PcrV.

Обычно антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, которые модифицированы некоторым образом, сохраняют способность специфически связываться с PcrV, например, сохраняют по меньшей мере 10% от своей активности связывания с PcrV (по сравнению с исходным антителом) при выражении этой активности на основе молей. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению сохраняют по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или больше от аффинности связывания с PcrV исходного антитела. Также предусматривается, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены (называемые "консервативными вариантами" или "вариантами с сохранением функции" антитела), которые по сути не изменяют их биологическую активность.

"Вариант" полинуклеотида относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70-99,9% (например, по меньшей мере приблизительно 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентичностью с эталонной нуклеотидной последовательностью, представленной в данном документе (например, SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49 или 57); при выполнении сравнения с помощью алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, порог значения ожидания: 10; длина слова: 28; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; показатели совпадения/несовпадения: 1, -2; штрафы за гэп: линейные).

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

"Вариант" полипептида, такого как цепь иммуноглобулина (например, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, HC или LC H1H29329P, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, HC или LC H1H29332P, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, HC или LC H1H29336P или V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, HC или LC H1H29339P) относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70-99,9% (например, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентичностью или сходством с эталонной аминокислотной последовательностью, представленной в данном документе (например, SEQ ID NO: 2, 10, 65, 66, 18, 26, 67, 68, 34, 42, 69, 70, 50, 58, 71 или 72); при выполнении сравнения с помощью алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, порог значения ожидания: 10; длина слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; матрица BLOSUM 62; штрафы за гэп: наличие - 11, удлинение - 1; условная корректировка композиционной матрицы замен).

Применительно к полипептидам термин "сходство по сути" или "по сути сходный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с использованием значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. Термин "консервативно модифицированный вариант" или "консервативная замена", относится к варианту, где имеется одна или более замен аминокислот в полипептиде на другие аминокислоты, обладающие сходными характеристиками (например зарядом, размером боковой цепи, гидрофобностью/гидрофильностью, конформацией остова и жесткостью и т.д.). Такие изменения зачастую могут быть осуществлены без значительного нарушения биологической активности антитела или фрагмента. Специалистам в данной области

техники известно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по сути не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально сходных аминокислот с меньшей вероятностью существенно нарушат биологическую активность.

В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная доля или степень сходства можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. (См., например, публикацию Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспаргат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспаргат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

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

Антигенсвязывающие белки, связывающие PcrV, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, в одном варианте осуществления содержат переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотами, представленными под SEQ ID NO: 2, 18, 34 или 50; и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотами, представленными под SEQ ID NO: 10, 26, 42 или 58.

Кроме того, вариант антигенсвязывающего белка, связывающего PcrV, может содержать полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая представлена в данном документе, за исключением одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) мутаций, таких как, например, миссенс-мутации (например, консервативные замены), нонсенс-мутации, делеции или вставки. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, которые содержат вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, 18, 34 или 50, но имеющую одну или более из таких мутаций, и/или вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, 26, 42 или 58, но имеющую одну или более из таких мутаций. В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант антигенсвязывающего белка, связывающего PcrV, содержит вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где одна или более (например, 1, или 2, или 3) из таких CDR имеют одну или более из таких мутаций (например, консервативных замен), и/или вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где одна или более (например, 1, или 2, или 3) из таких CDR имеют одну или более из таких мутаций (например, консервативных замен).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены варианты антигенсвязывающих белков,

связывающих PcrV, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие один или более вариантов CDR (например, любой один или более из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, и/или LCDR3), которые представлены в данном документе по меньшей мере с 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% идентичности последовательности или сходства с, например, SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и/или 16; или 20, 22, 24, 28, 30 и/или 32; или 36, 38, 40, 44, 46 и/или 48; или 52, 54, 56, 60, 62 и/или 64.

Варианты осуществления настоящего изобретения также включают варианты антигенсвязывающих белков, например, антитела к PcrV и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат  $V_H$  и  $V_L$  иммуноглобулина, или HC и LC, которые содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся 70% или большей (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) общей идентичностью аминокислотной последовательности или сходством с аминокислотными последовательностями соответствующих  $V_H$ ,  $V_L$ , HC или LC, конкретно представленных в данном документе, но где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3 таких иммуноглобулинов не являются вариантами и содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и/или 16; или 20, 22, 24, 28, 30 и/или 32; или 36, 38, 40, 44, 46 и/или 48; или 52, 54, 56, 60, 62 и/или 64, соответственно. Таким образом, в таких вариантах осуществления CDR в вариантах антигенсвязывающих белков как таковых не являются вариантами.

Функционально-консервативные варианты антител к PcrV и их антигенсвязывающих фрагментов также являются частью настоящего изобретения. Любой из вариантов антител к PcrV и их антигенсвязывающих фрагментов (как обсуждается в данном документе) может быть "функционально-консервативным вариантом". Такие функционально-консервативные варианты в некоторых случаях также могут быть охарактеризованы как консервативно модифицированные варианты. "Функционально-консервативные варианты", как используется в данном документе, относятся к вариантам антител к PcrV или их антигенсвязывающих фрагментов, в которых один или более аминокислотных остатков были изменены без значительного изменения одного или более функциональных свойств антитела или фрагмента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения функционально-консервативный вариант антитела к PcrV или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению предусматривает вариант аминокислотной последовательности и проявляет одно или более из следующих функциональных свойств:

связывается с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

связывается с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;

демонстрирует нейтрализацию штамма 6077 P. aeruginosa с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно  $10^{-8}$  М в анализе цитотоксичности;

демонстрирует нейтрализацию штамма ATCC 700888 P. aeruginosa с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе цитотоксичности;

демонстрирует нейтрализацию штамма 6077 P. aeruginosa с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М в анализе бляшкообразования;

демонстрирует нейтрализацию штамма ATCC 700888 P. aeruginosa с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе бляшкообразования;

снижает смертность от штамма 6206 или штамма 6077 P. aeruginosa у мышей, профилактически обработанных 5 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

снижает смертность от штамма 6206 или штамма 6077 P. aeruginosa у мышей, профилактически обработанных 1,0, 0,2 или 0,04 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

снижает бактериальную нагрузку в легких штамма 6206 P. aeruginosa у мышей, профилактически обработанных 0,1 мг/кг или 0,2 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

снижает бактериальную нагрузку в легких штамма PA01 P. aeruginosa у мышей, профилактически обработанных 25 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии; и/или

перекрестно конкурирует с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1;

связывается с полноразмерным PcrV (SEQ ID NO: 77) с  $EC_{50}$  менее приблизительно  $10^{-8}$  М;

связывается с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81) с  $EC_{50}$  менее приблизительно  $10^{-8}$  М;

взаимодействует с аминокислотными остатками от положения приблизительно 150 до положения приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78;

взаимодействует с аминокислотными остатками, находящимися в положениях от приблизительно 155 до приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и/или

взаимодействует по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86.

Выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое приводит к требуемому эффекту, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в уменьшении тяжести, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, такого как инфекция, вызванная *P. aeruginosa*. Субъект может иметь инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, или он может быть предрасположен к развитию инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. Субъекты, "предрасположенные к развитию инфекции, вызванной *P. aeruginosa*", или субъекты, "которые могут быть подвержены повышенному риску заражения инфекцией *P. aeruginosa*", представляют собой субъектов из группы, состоящей из субъекта, подвергающегося хирургической операции, субъекта, получающего лечение от серьезного заболевания, пациента с травмой, человека, употребляющего наркотики внутривенным путем, субъекта с тяжелыми ожогами, субъекта, использующего дыхательный аппарат, субъекта с катетером, субъекта, подвергающегося химиотерапии, субъекта с диабетом, субъекта с муковисцидозом, субъекта с туберкулезом, субъекта с ВИЧ и субъекта с ослабленной иммунной системой.

Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, где цель состоит в том, чтобы устранить или уменьшить бактериальную нагрузку возбудителя инфекции у субъекта, у которого клинически диагностирована инфекция, такая как пневмония, бактериемия, перитонит, сепсис и/или абсцесс. Термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. у субъекта может отсутствовать инфекция или у него могут быть снижены или отсутствовать бактериальные титры при введении терапевтического средства, такого как антитело, описанное в данном документе. "Лечение" также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без лечения. Нуждающиеся в лечении включают тех, кто уже инфицирован, а также тех, кто предрасположен к заражению инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, например, пациентов с ожогами или пациентов с ослабленным иммунитетом, восприимчивых к бактериальной инфекции, например, инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Используемые в данном документе термины "предупреждать" или "смягчать" относятся к профилактическим или предупредительным мерам, где цель состоит в том, чтобы предупредить или замедлить (уменьшить интенсивность проявления) инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, или симптом, связанный с инфекцией. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов, уменьшение степени инфекции, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, устранение или уменьшение возбудителя инфекции, такого как *P. aeruginosa*, у субъекта, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или смягчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую.

Используемые в данном документе термины "внутрибольничное заболевание" и "внутрибольничная инфекция" относятся к заболеванию или инфекции, возникшей в больнице или другом медицинском учреждении. Внутрибольничные инфекции могут быть вызваны *P. aeruginosa*, например, *P. aeruginosa*, устойчивой к антибиотикам. В определенных аспектах внутрибольничная инфекция не присутствует или она находится в инкубационном периоде до госпитализации субъекта в больницу или медицинское учреждение, и она развивается или передается субъекту после госпитализации субъекта в больницу или медицинское учреждение.

#### Общее описание

Как описано выше, бактериальная T3SS является важным фактором вирулентности грамотрицательных бактерий, включая *P. aeruginosa*. Белок PcrV, расположенный на конце аппарата T3SS, образует структуру кольцевого типа на кончике иглы. Белок кончика иглы доступен для антител как один из двух белков, присутствующих на внешней поверхности бактерий.

По существу, в данном документе предусмотрены антитела, биспецифические антигенсвязывающие молекулы и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают PcrV *P. aeruginosa*. Антитела, нацеленные на PcrV, могут предотвращать инъекцию бактериальных токсинов в инфицированную клетку, что приводит к уменьшению воспаления, гибели клеток и распространению бактерий. Антитела, нацеленные на PcrV, могут блокировать опосредованную порами проницаемость мембраны в инфицированной клетке-хозяине. Эти антитела к PcrV, биспецифические антигенсвязывающие молекулы и их антигенсвязывающие фрагменты применимы в лечении и/или смягчении инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, лечении и/или смягчении симптомов инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, и предупреждении развития или прогрессирования симптомов инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах антитела к PcrV предупреждают развитие или прогрессирование пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*.

В данном документе предусмотрены способы лечения пациентов с инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*. В данном документе предусмотрены способы предупреждения развития или прогрессирования симптомов инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. В данном документе предусмотрены способы предупреждения признаков инфицирования *P. aeruginosa*, таких как положительный посев крови, кожи, мочи, гноя

или других образцов биологических жидкостей, или рентгенографические изображения, указывающие на инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, или результаты физического обследования, указывающие на инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, такие как без ограничения язвы кожи или костей или отклонение показателей жизненно важных функций. В некоторых аспектах пациент может иметь муковисцидоз. В некоторых аспектах пациент может быть подключен к аппарату искусственной вентиляции легких. В некоторых аспектах пациент представляет собой пациента с нейтропеническим раком. В некоторых аспектах пациент представляет собой индивидуума, перенесшего ожоговую травму. В некоторых аспектах пациент болен туберкулезом.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет устойчивую к антибиотикам инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет совместную инфекцию, такую как инфекция, вызванная *S. aureus*, например устойчивая к антибиотикам инфекция, вызванная *S. aureus*. В некоторых вариантах осуществления инфекции, вызванные как *S. aureus*, так и *P. aeruginosa*, являются устойчивыми к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет совместную инфекцию, вызванную грамотрицательными бактериями или грамположительными бактериями.

#### Общие способы

Стандартные способы в молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2<sup>nd</sup> Edition, 2001 3<sup>rd</sup> Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif.). Стандартные способы также представлены в Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y., в котором описаны клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3), а также биоинформатика (том 4).

Описаны способы очистки белков, в том числе иммунопреципитация, хроматография, электрофорез, центрифугирование и кристаллизация (Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, Mo.; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны получение, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane, выше). Доступны стандартные методики определения характеристик взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Можно получить моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела (см., например, Shepherd and Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, N.Y.; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 139-243; Carpenter, et al. (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He, et al. (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-883; Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; патент США № 6329511).

Альтернативой гуманизации является применение библиотек человеческих антител, представленных на поверхности фагов, или библиотек человеческих антител в организмах трансгенных мышей (Vaughan et al. (1996) *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas et al. (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Kay et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, Calif.; de Bruin et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399). Описаны одноцепочечные антитела и диатела (см., например, Malecki et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson and Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; и патент США №4946778). Представлены бифункциональные антитела (см., например, Mack, et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkell, et al. (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, et al. (1985) *Science* 229:81-83; Raso, et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, et al. (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; и патенты США №№ 5932448, 5532210 и 6129914). Полностью человеческие антитела также можно разрабатывать в организмах мышей, полученных методами генной инженерии, таких как *VelociMouse*. См., например, DeChiara et al., *Producing fully ES cell-derived mice from eight-cell stage embryo injections*, *Methods Enzymol.* 476:285-94 (2010); DeChiara et al., *VelociMouse: fully ES cell-derived F0-generation mice obtained from the injection of ES cells into eight-cell-stage embryos*, *Methods Mol Biol.* 530:311-24 (2009); патенты США №№ 7576259;

7659442 или 7294754 и US 2008/0078000 A1.

Очистка антигена обычно не является необходимой для получения антител. Животных можно иммунизировать клетками, несущими антиген, представляющий интерес. Затем спленоциты можно выделить из организма иммунизированных животных и спленоциты можно слить с линией клеток миеломы для получения гибридомы (см., например, Meyaard et al. (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright et al. (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston et al., выше; Kaithamana et al. (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Антитела можно конъюгировать, например, с низкомолекулярными лекарственными средствами, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (PEG). Антитела применимы для терапевтических, диагностических целей, использования в наборе или других целей и включают антитела, связанные, например, с красителями, радиоактивными изотопами, ферментами или металлами, например коллоидным золотом (см., например, Le Doussal et al. (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini et al. (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts et al. (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Доступны способы проточной цитометрии, в том числе сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS) (см., например, Owens, et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2.sup.nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, N.J.; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.). Доступны флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, в том числе праймеров и зондов на основе нуклеиновых кислот, полипептидов и антител, для применения, например, в качестве диагностических реагентов (*Molecular Probes (2003) Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.; *Sigma-Aldrich (2003) Catalogue*, St. Louis, Mo.).

Описаны стандартные способы гистологического исследования иммунной системы (см., например, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, N.Y.; Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, Pa.; Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, N.Y.).

Доступны пакеты программного обеспечения и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, укладки белков, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и выравнивания последовательностей (см., например, GenBank, пакет программ Vector NTI® (Informax, Inc, Бетесда, Мэриленд); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., Сан-Диего, Калифорния); DeCypher® (TimeLogic Corp., Кристал-Бэй, Невада); Menne, et al. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

#### Антитела к PcrV

Пассивную иммунотерапию для профилактики или лечения инфекционных заболеваний использовали в течение более чем столетия, как правило, в форме конвалесцентной человеческой сыворотки, которая содержит высокие титры нейтрализующих антител (Good et al., 1991; *Cancer* 68: 1415-1421). В настоящее время несколько очищенных моноклональных антител проходят доклинические и клинические исследования для применения в качестве противомикробных средств (Marasco et al 2007; *Nature Biotechnology* 25: 1421-1434). Были описаны определенные антитела, которые связываются с PcrV *P. aeruginosa* (см., например, François et al., 2012; *Crit. Care Med.* 40: 2320-2326; и WO 2009088032).

Авторы настоящего изобретения в данном документе описывают полностью человеческие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PcrV *P. aeruginosa* и модулируют T3SS-опосредованный механизм вирулентности. Антитела к PcrV могут связываться с PcrV с высокой аффинностью. В определенных вариантах осуществления антитела могут связываться с PcrV и предотвращать или уменьшать степень гибели клеток. В определенных вариантах осуществления антитела могут предотвращать транслокацию бактериальных токсинов в клетку-хозяина и, таким образом, могут подавлять или нейтрализовать инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*. В некоторых вариантах осуществления функция антител может проявляться в блокировании проницаемости мембраны в клетке-хозяине, опосредованной порами, образованными T3SS. В определенных вариантах осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, могут опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и, таким образом, могут способствовать разрушению клеток, в которых содержатся бактерии. В определенных вариантах осуществления антитела могут действовать обоими способами, например они могут нейтрализовать бактериальную инфекционность и могут опосредовать ADCC. В некоторых аспектах антитела могут снижать бактериальную нагрузку, например бактериальную нагрузку в легких, по сравнению с находящимися в аналогичном положении, но не подвергавшимися лечению субъектами или популяциями. В некоторых аспектах антитела могут увеличивать выживаемость или снижать смертность по сравнению с находящимися в аналогичном положении, но не подвергавшимися лечению субъектами или популяциями. В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть применимы для лечения субъекта, страдающего от инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. При введении нуждающемуся в этом субъекту антитела могут уменьшать у субъекта степень инфицирования, осуществляемого *P. aeruginosa*. Их можно применять отдельно или в качестве вспомогательной

терапии с другими терапевтическими молекулами или способами воздействия, известными из уровня техники, для лечения бактериальной инфекции. Кроме того, идентифицированные антитела можно применять профилактически (до инфицирования) для защиты субъекта, например млекопитающего, от инфекции или можно применять терапевтически (после развития инфекции) для облегчения ранее развившейся инфекции или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией.

Полноразмерная аминокислотная последовательность белка PcrV *P. aeruginosa* представлена в GenBank под номером доступа 250397.1, и также под SEQ ID NO: 77. Усеченный белок PcrV (PcrV<sub>136-257</sub>) представлен под SEQ ID NO: 79. Оба белка могут быть помечены 6-гистидиновой меткой: SEQ ID NO: 78 для полноразмерного PcrV и SEQ ID NO: 80 для усеченного PcrV.

В определенных вариантах осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, получены от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный PcrV, или усеченной версией белка. Иммуноген может представлять собой любой иммуногенный фрагмент белка PcrV или ДНК, кодирующую его активный фрагмент. Эти пептиды можно модифицировать для добавления или замены определенных остатков для введения метки или в целях конъюгирования с молекулами носителя, такого как KLH. Например, цистеин можно добавлять либо по N-концу, либо по C-концу пептида, или можно добавлять линкерную последовательность с целью получения пептида для конъюгирования, например, KLH для иммунизации.

Определенные антитела к PcrV, раскрытые в данном документе, способны связываться с и нейтрализовать активность *P. aeruginosa*, как определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по настоящему изобретению связываться с и нейтрализовать активность *P. aeruginosa* можно измерить с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в данной области техники, включая анализы связывания или анализы активности, описанные в данном документе.

Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примере 3 данного документа. В примере 3 аффинность связывания и константы диссоциации антител к PcrV для полноразмерного PcrV (6his-меченного, SEQ ID NO: 78) или усеченного PcrV (6his-меченного, SEQ ID NO: 80) определяли с помощью Biacore. В примерах 6 и 7 анализы нейтрализации использовали для определения способности антител нейтрализовать два разных штамма *P. aeruginosa*.

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

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

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi)

dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе небольшого модульного белка (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", используемым в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится в смежном положении или в одной рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен  $V_H$ , ассоциированный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут располагаться друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i)  $V_H$ - $C_H1$ , (ii)  $V_H$ - $C_H2$ , (iii)  $V_H$ - $C_H3$ , (iv)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ , (v)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ , (vi)  $V_H$ - $C_H2$ - $C_H3$ , (vii)  $V_H$ - $C_L$ , (viii)  $V_L$ - $C_H1$ , (ix)  $V_L$ - $C_H2$ , (x)  $V_L$ - $C_H3$ , (xi)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ , (xii)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ , (xiii)  $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$  и (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены посредством целой шарнирной или линкерной области или ее части. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций вариабельных и константных доменов, изложенных выше, нековалентно связанных друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

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

#### Получение человеческих антител

Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с PcrV *P. aeruginosa*. Для получения антитела к PcrV можно использовать иммуноген, представляющий собой что-либо из следующего. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным PcrV, например с номерами доступа в GenBank NP\_250397.1 (SEQ ID NO: 77), или усеченным белком PcrV, например PcrV\_136-257 (SEQ ID NO: 79). Альтернативным образом, белок PcrV или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методик, а также модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления иммуноген представляет собой рекомбинантный белок PcrV или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой коммерчески доступный белок PcrV. В определенных вариантах осуществления можно вводить одну или более бустерных инъекций. В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать один или более коммерчески доступных белков PcrV. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок PcrV, экспрессируемый в *E.coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

С помощью технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моно-

клональных антител первоначально выделяют химерные антитела к PcrV с высокой аффинностью, содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие переменные области тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышиных константных областей, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем экспрессируют ДНК в клетке, способной к экспрессии полностью человеческого антитела.

Как правило, мыши VELOCIMMUNE® вводят представляющий интерес антиген, и от мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы с получением immortalized линий клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с константными областями требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок, представляющий собой антитело, может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Мышиные константные области заменяют на требуемые человеческие константные области с получением полностью человеческого антитела, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Несмотря на то, что отобранная константная область может быть различной в зависимости от конкретного применения, характеристики, касающиеся высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи переменной области.

#### Биологические эквиваленты

Антитела к PcrV и фрагменты антител, раскрытые в данном документе, охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать PcrV. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, однако проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК по настоящему изобретению, кодирующие антитело, охватывают последовательности, которые содержат одно или более из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по сути биологически эквивалентны антителу или фрагменту антитела, раскрытым в данном документе.

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

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

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если пациента можно перевести один или более раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска возникновения побочных эффектов, в том числе значимого с клинической точки зрения изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности по сравнению с таковой при продолжении терапии без такого перевода.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

Биологическую эквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения степени биологической эквивалентности включают, например, (а) тест *in vivo* у людей

или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в виде зависимости от времени; (b) тест *in vitro* который коррелировал с данными биологической доступности *in vivo* у человека и с достаточной точностью предсказывал их; (c) тест *in vivo* у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в виде зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

Биологически эквивалентные варианты антител, раскрытых в данном документе, можно сконструировать с помощью, например, осуществления разных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антитела, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые обеспечивают устранение или исключают гликозилирование.

#### Антитела к PcrV, содержащие варианты Fc

В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к PcrV, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к PcrV, содержащие мутацию в C<sub>H</sub>2- или C<sub>H</sub>3-области Fc-домена, где мутация(и) обеспечивает(ют) повышение аффинности Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьируется от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S), модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F), модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y), модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E), модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, в данном документе предусмотрены антитела к PcrV, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Объемом настоящего изобретения предусмотрены все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-доме и другие мутации в пределах варьируемых доменов антитела, раскрытых в данном документе.

Настоящее изобретение также включает антитела к PcrV, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C<sub>H</sub>), где химерная область C<sub>H</sub> содержит сегменты, полученные из областей C<sub>H</sub> более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерную область C<sub>H</sub>, содержащую часть домена C<sub>H</sub>2 или весь этот домен, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с частью домена C<sub>H</sub>3 или всем этим доменом, полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, содержат химерную область C<sub>H</sub>, содержащую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки из положений 216-227 в соответствии с нумерацией EU), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки из положений 228-236 в соответствии с нумерацией EU), полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной последовательности человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной последовательности человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерную область C<sub>H</sub>, описанное в данном документе, может в определен-

ных вариантах осуществления проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на патент США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 года).

Биологические характеристики антител В целом антитела по настоящему изобретению осуществляют свои функции путем связывания с PcrV. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают PcrV или PcrV\_136-257 (например, при 25°C или при 37°C) с  $K_d$  менее  $10^{-7}$  М, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием формата анализа, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PcrV с  $K_D$ , составляющей менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 500 пМ, менее 250 пМ или менее 100 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием формата анализа, описанного в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают PcrV с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ), составляющим более приблизительно 10 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, или более приблизительно 1 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например с использованием формата анализа, определенного в данном документе, или по сути аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают PcrV с  $t_{1/4}$ , составляющим более чем приблизительно 1 мин, более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 100 мин, более чем приблизительно 200 мин, более чем приблизительно 300 мин, более чем приблизительно 400 мин, более чем приблизительно 500 мин, более чем приблизительно 600 мин, более чем приблизительно 700 мин, более чем приблизительно 800 мин, более чем приблизительно 900 мин или более чем приблизительно 1000 мин, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C, например с использованием формата анализа, определенного в данном документе (например, формата захвата mAb или захвата антигена), или по сути аналогичного анализа.

Также в данный документ включены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые нейтрализуют опосредованную PcrV *P. aeruginosa* токсичность, например в клетках A549, как показано в примере 6. В некоторых вариантах осуществления антитела проявляют активность нейтрализации против штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитела проявляют активность нейтрализации против штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М. Антитела, предусмотренные в данном документе, также нейтрализуют опосредованный PcrV *P. aeruginosa* гемолиз эритроцитов, как показано в примере 7. В некоторых вариантах осуществления антитела проявляют активность нейтрализации против штамма 6077 с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитела проявляют активность нейтрализации против штамма ATCC 700888 с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-8}$  М. Кроме того, антитела, предусмотренные в данном документе, перекрестно конкурируют с другими антителами, которые связывают PcrV, как показано в примере 4.

В данный документ также включены антитела, которые предупреждают индивидуальную смертность или снижают уровни смертности населения. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить профилактически. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить терапевтически. В некоторых вариантах осуществления антитела при введении в дозе 5 мг/кг демонстрируют 100% улучшение выживаемости на мышинной модели пневмонии, как показано в примере 8. В некоторых вариантах осуществления антитела демонстрируют улучшенную выживаемость даже при более низких дозах, например 1 мг/кг, или 0,2 мг/кг, или даже 0,04 мг/кг, как показано в примере 9.

В данный документ также включены антитела, которые снижают бактериальную нагрузку, например бактериальную нагрузку в легких, у субъекта или популяции. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить профилактически. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить терапевтически. В некоторых вариантах осуществления антитела при введении в дозе 0,1 или 0,2 мг/кг или 25 мг/кг демонстрируют снижение бактериальной нагрузки на 3-4 log больше, чем у необработанных субъектов в мышинной модели пневмонии, как показано в примере 10 и примере 11.

В одном варианте осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, могут иметь одну или более из следующих характеристик: (а) содержать три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариационной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34 и 50; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариационной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42 и 58; (а) содержать три определяющие комплементарности области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариационной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34 и 50; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2

и Lcdr3), содержащиеся в любой из последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42 и 58; (b) представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела; (c) связываются с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при  $25^\circ\text{C}$ ; (d) связываются с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при  $37^\circ\text{C}$ ; (e) демонстрируют нейтрализацию штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно  $10^{-8}$  М в анализе цитотоксичности; (f) демонстрирует нейтрализацию штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе цитотоксичности; (g) демонстрируют нейтрализацию штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М в анализе бляшкообразования; (h) демонстрируют нейтрализацию штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе бляшкообразования; (i) снижают смертность от штамма 6206 или штамма 6077 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 5 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии; (j) снижают смертность от штамма 6206 или штамма 6077 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 1,0, 0,2 или 0,04 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии; (k) снижают бактериальную нагрузку легких штамма 6206 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 0,1 мг/кг или 0,2 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии; (l) снижают бактериальную нагрузку в легких штамма PA01 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 25 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии; и/или (m) перекрестно конкурируют с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1.

В родственном варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предусмотренные в данном документе, могут иметь одну или более из следующих характеристик: (n) связываются с полноразмерным PcrV (SEQ ID NO: 77) с  $EC_{50}$  менее приблизительно  $10^{-8}$  М; (o) связываются с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81) с  $EC_{50}$  менее приблизительно  $10^{-8}$  М; (p) взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (i) аминокислотных остатков от положения приблизительно 150 до положения приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и из (ii) аминокислотных остатков от положения приблизительно 155 до приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и/или (q) взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86.

Антитела, предусмотренные в данном документе, могут обладать одной или более упомянутыми выше биологическими характеристиками или любыми их комбинациями. Определенные свойства антител обобщены ниже. Другие биологические характеристики антител будут очевидны специалисту в данной области техники из обзора настоящего изобретения, включая предусмотренные в данном документе практические примеры.

#### Эпитопное картирование и родственные технологии

В данном документе предусмотрены антитела к PcrV, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в белке PcrV *P. aeruginosa*. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности, состоящей из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах белка PcrV (например, линейного эпитопа в домене). В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах белка PcrV (например, конформационный эпитоп). В качестве иллюстрации, антитела к PcrV или их антигенсвязывающие фрагменты, предусмотренные в данном документе, могут связываться с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81); могут взаимодействовать с аминокислотными остатками от положения приблизительно 150 до положения приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; могут взаимодействовать с аминокислотными остатками от положения приблизительно 155 до приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78;

и/или могут взаимодействовать по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86.

Разные методики, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для определения наличия "взаимодействия с одной или более аминокислотами" антитела в пределах полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие, как описаны в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк). Другие способы включают аланин-сканирующий мутагенез, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования с расщеплением пептидов и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстрагирование эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-

спектрометрии. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченным дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному дейтерий-водородному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности взаимодействия. В результате аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, проявлять относительно более высокие массы по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, за счет чего выявляют остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Chemistry* 267: 252-259; Engen и Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

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

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

В определенных вариантах осуществления антитела к PcrV или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах любой одной или более областей, представленных в белке PcrV, либо в природной форме, либо форме, полученной рекомбинантным путем, либо с его фрагментом.

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

Используя стандартные способы, известные в данной области техники, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело к PcrV, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело к PcrV по настоящему изобретению, обеспечивают возможность связывания эталонного антитела с белком или пептидом PcrV в условиях насыщения. Затем оценивается способность тестируемого антитела связываться с белком PcrV. Если тестируемое антитело способно связываться с PcrV после насыщающего связывания с эталонным антителом к PcrV, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к PcrV. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком PcrV после насыщающего связывания с эталонным антителом к PcrV, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным антителом к PcrV, предусмотренным в данном документе.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к PcrV, описанная выше методика исследования связывания осуществляется в двух направлениях: в первом направлении обеспечивается возможность связывания эталонного антитела с белком PcrV в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с белком PcrV. Во втором направлении обеспечивается возможность связывания тестируемого антитела с белком PcrV в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с белком PcrV. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно к связыванию с белком PcrV, то делается заключение, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с PcrV. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, как и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежно-

го эпитопа.

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

В дальнейшем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (например, анализы с внесением в пептиды мутаций и анализы связывания) для того, чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено фактом связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или что причиной отсутствия наблюдаемого связывания является пространственное блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно проводить с использованием ELSA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, существующего в данной области техники.

#### Иммуноконъюгаты

В настоящем изобретении предусмотрено человеческое моноклональное антитело к PcrV, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгатом"), таким как антибиотик, для лечения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. Используемый в данном документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым фрагментом или фрагментом-репортером, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средством. Данное антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым фрагментом или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или терапевтическим средством в любом месте по всей длине молекулы, которая является настолько длинной, что она способна связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитела и лекарственного средства и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления данное средство может представлять собой второе отличающееся антитело к *P. aeruginosa*. В определенных вариантах осуществления данное антитело может быть конъюгировано со средством, которое является специфичным по отношению к инфицированным клеткам. При выборе типа терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к PcrV, примут во внимание подлежащее лечению состояние и требующий достижения терапевтический эффект. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники; см., например, WO 05/103081.

#### Полиспецифические антитела

Антитела, предусмотренные в данном документе, могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими.

Полиспецифические антитела могут быть специфичными в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

Любые из предусмотренных в данном документе полиспецифических антигенсвязывающих молекул или их вариантов можно конструировать с применением стандартных молекулярно-биологических методик (например технологии рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к *P. aeruginosa*, получают в биспецифическом формате ("биспецифическое"), в котором переменные области, связывающиеся с отличающимися доменами PcrV *P. aeruginosa*, соединены вместе для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Полученные соответствующим образом свойства биспецифичности могут усиливать общую ингибиторную в отношении T3SS эффективность посредством увеличения как специфичности, так и авидности связывания. Переменные области, специфичные в отношении отдельных доменов, или те, которые могут связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере для создания биспецифичности переменные области тяжелой цепи ( $V_H$ ) из связывающей молекулы со специфичностью в отношении одного домена подвергаются рекомбинации с переменными областями легкой цепи ( $V_L$ ) из ряда связывающих молекул со специфичностью в отношении второго домена для идентификации некогатных партнеров  $V_L$ , которые можно объединять в пару с исходным  $V_H$  без нарушения первоначальной специфичности  $V_H$ . Таким же способом можно объединять отдельный сегмент  $V_L$  (например,  $V_{L1}$ ) с двумя разными  $V_H$ -доменами (например,  $V_{H1}$  и  $V_{H2}$ ) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих "плечей" ( $V_{H1} - V_{L1}$  и  $V_{H2} - V_{L1}$ ). Использование отдельного сегмента  $V_L$  уменьшает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность

способов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN 13/022759 и US 2010/0331527).

В качестве альтернативы, антитела, которые связываются с несколькими доменами и второй мишенью, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к *P. aeruginosa*, можно получать в биспецифическом формате с использованием описанных в данном документе методик или других методик, известных специалисту в данной области техники. Варибельные области антитела, связывающиеся с отличающимися областями, можно соединять вместе с варибельными областями, которые связываются с соответствующими сайтами на, например, *P. aeruginosa*, для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Варибельные области, обладающие специфичностью в отношении одного антигена *P. aeruginosa*, объединяют с варибельными областями, обладающими специфичностью в отношении PcrV, и объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой варибельной области связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение C<sub>H</sub>3-домена первого иммуноглобулина (Ig) и C<sub>H</sub>3-домена второго Ig, где C<sub>H</sub>3-домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где отличие на по меньшей мере одну аминокислоту ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует отличие по аминокислотам. В одном варианте осуществления C<sub>H</sub>3-домен первого Ig связывается с белком А, а C<sub>H</sub>3-домен второго Ig содержит мутацию, которая способствует ослаблению или устранению связывания с белком А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT; H435R в соответствии с нумерацией согласно EU). Второй C<sub>H</sub>3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые могут присутствовать в пределах второго C<sub>H</sub>3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител на основе IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител на основе IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител на основе IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слитых белков IgG-scFv, двойной варибельный домен (DVD)-Ig, квадруму, "выступы-в-углубления", общую легкую цепь (например, общую легкую цепь со структурой "выступы-в-углубления" и т.п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-антитело, "лейциновую застежку", Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (для обзора вышеизложенных форматов см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и цитируемые в нем ссылки). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяются для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

#### Терапевтическое введение и составы

В настоящем изобретении предусмотрены терапевтические композиции, содержащие антитела к PcrV или их антигенсвязывающие фрагменты, как предусмотрено в данном документе. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, хорошо известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN<sup>TM</sup>), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. При использовании антитела по настоящему изобретению для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для предупреждения такого заболевания преимущественным является введение антитела, как правило, в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,01 до приблизительно 60 мг/кг массы тела, например приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 2,0 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 2,0 мг/кг, от приблизительно

5 мг/кг до приблизительно 60 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг или от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту введения и длительность лечения. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в качестве начальной дозы, составляющей от по меньшей мере приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 300 мг или от приблизительно 10 мг до приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В определенных вариантах осуществления после начальной дозы может следовать введение второй дозы или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно тем же что и в начальной дозе, или меньше начальной дозы, где последующие введения доз разделены интервалом времени, составляющим от по меньшей мере 6 ч до 24 часов; от по меньшей мере 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

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

Применение наночастиц для доставки антител, предусмотренных в данном документе, также рассматривается. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических путей применения. Наночастицы, конъюгированные с антителом, и способы их получения и применения подробно описаны в Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389). Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целенаправленного воздействия на инфицированные клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны в патентных документах, например, US 8257740 или US 8246995.

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

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

Фармацевтическую композицию можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприц-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприца-ручки может быть многодозовым или одноразовым. В многодозовом устройстве для доставки по типу шприца-ручки обычно применяют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж остался пустым, пустой картридж можно сразу

удалить в отходы и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприца-ручки затем можно повторно применять. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприца-ручки сменный картридж отсутствует. Вместо этого одноразовое устройство для доставки по типу шприца-ручки предварительно заполнено фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После освобождения резервуара от фармацевтической композиции устройство удаляют в отходы целиком.

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

Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в виде лекарственных форм со стандартной дозой, подобранной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные составы (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела, как правило, составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг на лекарственную форму со стандартной дозой; в частности в форме инъекционного состава; для других лекарственных форм предпочтительно, чтобы содержание антитела составляло от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 мг до приблизительно 250 мг.

#### Пути терапевтического применения антител

Антитела, предусмотренные в данном документе, являются применимыми для лечения и/или предупреждения (профилактического лечения) заболевания, или нарушения, или состояния, ассоциированного с инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, и/или для уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием.

В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, применимы для лечения субъекта, который имеет пневмонию, бактериемию, инфекцию костей, инфекцию суставов, инфекцию кожи, ожоговую инфекцию, раневую инфекцию, инфекцию мочевыводящих путей или любую их комбинацию, вызванную *P. aeruginosa*. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы облегчения или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, у субъекта. Например, одно или более антител к PcrV, раскрытых в данном документе, можно вводить для ослабления, или предупреждения, или снижения тяжести одного или более симптомов или состояний заболевания или нарушения. Антитела можно использовать для облегчения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, включая без ограничения лихорадку, озноб, головную боль, усталость, боль в суставах, скованность, миалгию, диарею, рвоту, боль, зуд, выделение жидкости из ушей, высыпания, заполненные гноем пустулы на коже, боль в глазах и покраснение глаз, пневмонию, кашель, заложенность носа, выделение зеленого гноя со сладким фруктовым запахом из мягких тканей и инфекцию мочевыводящих путей.

В данном документе также рассматривается профилактическое введение одного или более антител к PcrV, раскрытых в данном документе, субъектам с риском развития инфекции, таким как субъект, подвергающийся хирургической операции, субъект, получающий лечение от серьезного заболевания, субъект с тяжелыми ожогами, субъект, использующий дыхательный аппарат, субъект с катетером, субъект, получающий химиотерапию, субъект с диабетом, субъект с муковисцидозом, субъект с туберкулезом, субъект с ВИЧ или субъект с ослабленным иммунитетом.

Другие субъекты с риском возникновения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, включают, например, индивида с ослабленным иммунитетом вследствие аутоиммунного заболевания, или людей, получающих иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органов), с определенными формами анемии, которые истощают или разрушают лейкоциты, тех людей, которые получают лучевую или химиотерапию, или тех людей, которые имеют воспалительное нарушение.

Также в данном документе рассматривается введение одного или более антител к PcrV для нейтрализации инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. Воздействие на индивида или клетки приводит к усиленной защите от гибели клеток. В определенных вариантах осуществления воздействие может происходить *in vitro* или *in vivo*. Усиленная защита может наблюдаться, если антитело используют отдельно или если его используют в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или антителами к *P. aeruginosa*.

Также в данном документе рассматривается введение одного или более антител к PcrV для снижения бактериальной нагрузки у субъекта. В некоторых аспектах одно или более антител к PcrV или их антигенсвязывающие фрагменты снижают бактериальную нагрузку в легких субъекта. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут блокировать доставку токсинов *P. aeruginosa* в клетку-хозяина. В некоторых аспектах лечение с помощью антитела к PcrV, предусмотренного в данном документе, снижает бактериальную нагрузку *P. aeruginosa*. В некоторых аспектах лечение с помощью антитела к PcrV, предусмотренного в данном документе, снижает бактериальную нагрузку *P. aeruginosa* и бактерий, вызывающих совместную инфекцию, например грамотрицательных или грамположительных бактерий. В некоторых аспектах лечение с помощью антитела к PcrV, предусмотренного в данном документе, снижает бактериальную нагрузку *P. aeruginosa* и бактериальную нагрузку *S. aureus*.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, или субъекта, подверженного риску инфицирования *P. aeruginosa*.

Одно или более антител к PcrV можно вводить для увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего муковисцидозом. В некоторых аспектах у субъекта нет симптомов пневмонии на момент введения.

В дополнительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции, вызванной *P. Aeruginosa*, или подверженных риску ее возникновения. В другом варианте осуществления антитела по настоящему изобретению применяют в качестве вспомогательной терапии с каким-либо другим средством или любым другим видом терапии, известными специалистам в данной области техники, применимыми для лечения или уменьшения тяжести инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

#### Виды комбинированной терапии

Виды комбинированной терапии могут включать антитело к PcrV, раскрытое в данном документе, и какое-либо дополнительное терапевтическое средство, которое можно преимущественно объединять с таким антителом или с его биологически активным фрагментом. Антитела можно синергически объединять с одним или более лекарственными средствами или средствами, применяемыми для лечения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

Иллюстративные средства для лечения бактериальной инфекции могут включать, например, антибиотики, противовоспалительные лекарственные средства (такие как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), другое антитело к *P. Aeruginosa* или любое другое средство паллиативной терапии для лечения симптома инфекции, вызванной *P. Aeruginosa*, или для снижения бактериальной нагрузки у пациента. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое способствует противодействию или снижению любого(ых) возможного(ых) побочного(ых) эффекта(ов), ассоциированного(ых) с антителом к PcrV или его антигенсвязывающим фрагментом, если такой(е) побочный(е) эффект(ы) будет(т) возникать.

Иллюстративные средства, которые можно преимущественно объединять с антителом к PcrV, включают без ограничения другие средства, которые связывают и/или подавляют активность *P. aeruginosa* (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые не связывают непосредственно PcrV или другой антиген *P. aeruginosa*, но тем не менее подавляют активность бактерии, в том числе способность инфицировать клетки-хозяева. В некоторых аспектах второе терапевтическое средство может представлять собой терапевтическое средство для лечения инфекций, связанных с другим организмом, который может вызывать совместную инфекцию с *P. aeruginosa*, например грамположительным организмом или грамотрицательным организмом, например таким организмом, как *S. aureus*. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой терапевтическое средство, применимое для лечения совместной инфекции. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство применимо для лечения совместной инфекции с *S. aureus*.

Иллюстративные антибиотики для комбинирования с антителами к PcrV антител включают: пенициллины (пиперациллин, пиперапирин/тазобактам, мезлоциллин, тикарциллин, тикарциллин/клавуланат), цефалоспорины (цефтазидим, цефоперазон, цефепим), карбапенемы (имипенем/циластатин, меропенем), монобактамы (азтреонам), аминогликозиды (тобрамицин, гентамицин, амикацин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин) и другие (полимиксин В, колистин). Общие схемы лечения включают: при бактериемии: пенициллин плюс аминогликозид; пенициллин плюс цiproфлоксацин; цефалоспорин, азтреонам или карбапенем плюс аминогликозид или цiproфлоксацин; при инфекции ЦНС: цефтазидим, необязательно плюс аминогликозид; цефепим; цiproфлоксацин; азтреонам; меропенем; при инфекции костей или суставов: пенициллин плюс аминогликозид или цiproфлок-

сацин; цефалоспорин; азтреонам; фторхинолон; карбапенем; при наружном отите: цефалоспорин; карбапенем; цiproфлoксацин; цефалоспорин плюс аминогликозид; при кератините/язве роговицы (глаз): тобрамицин (местно), необязательно с пиперациллином или тикарциллином (местно); цiproфлoксацин или офлoксацин (местно); и при инфекциях мочевыводящих путей: цiproфлoксацин; аминогликозид; пенициллин; цефалоспорин; карбапенем. (См., например, Kasper, D. L, et al., eds: Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th Ed., McGraw-Hill, 2005).

В одном варианте осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств предусматривают одно или более антител к PcrV. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой еще одно другое антитело, например другое антитело к P. aeguginosa, где другое антитело или антитела могут связывать PcrV или не связывать его, или связываться с одним и тем же эпитопом на PcrV или с перекрывающимся эпитопом. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой антитело к другому антигену P. aeguginosa. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой антитело к другим инфекционным бактериям, например S. aureus. В некоторых вариантах осуществления некоконкурентные антитела можно комбинировать и вводить нуждающемуся в этом субъекту. Антитела, составляющие комбинацию, могут блокировать активность механизма T3SS и/или подавлять какую-либо другую активность бактерий.

Используемое в данном документе выражение "в комбинации с" означает, что дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить до введения, одновременно с ним или после введения по меньшей мере одного антитела к PcrV, предусмотренного в данном документе. Выражение "в комбинации с" также включает последовательное или совместное введение антитела к PcrV и второго терапевтического средства.

Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту до введения антитела к PcrV. Например, первый компонент может считаться введенным "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 ч до, за 60 ч до, за 48 ч до, за 36 ч до, за 24 ч до, за 12 ч до, за 6 ч до, за 5 ч до, за 4 ч до, за 3 ч до, за 2 ч до, за 1 ч до, за 30 мин до, за 15 мин до, за 10 мин до, за 5 мин до или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела к PcrV. Например, первый компонент может считаться введенным "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, через 5 мин после, через 10 мин после, через 15 мин после, через 30 мин после, через 1 ч после, через 2 ч после, через 3 ч после, через 4 ч после, через 5 ч после, через 6 ч после, через 12 ч после, через 24 ч после, через 36 ч после, через 48 ч после, через 60 ч после или через 72 ч после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к PcrV. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение субъекту антитела к PcrV и дополнительного терапевтически активного компонента в единичной дозированной лекарственной форме или в отдельных дозированных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 мин или менее относительно друг друга. При введении в виде отдельных дозированных лекарственных форм каждая дозированная лекарственная форма может быть введена посредством одного и того же пути (например, как антитело к PcrV, так и дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен внутривенно и т.д.); в качестве альтернативы, каждая дозированная лекарственная форма может быть введена посредством разных путей (например, антитело к PcrV может быть введено внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен перорально). В любом случае все способы введения компонентов в единичной дозированной лекарственной форме, в отдельных дозированных лекарственных формах или в виде отдельных дозированных лекарственных форм посредством разных путей введения считаются "одновременным введением" для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение антитела к PcrV "перед", "одновременно" или "после" (согласно определениям данных терминов в данном документе, приведенным выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением антитела к PcrV "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к PcrV, описанное в данном документе, составлено вместе с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других местах в данном документе.

#### Схемы введения

В соответствии с определенными вариантами осуществления однократную дозу антитела к PcrV, раскрытого в данном документе (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к PcrV и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в данном документе), можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом. В соответствии с определенными вариантами осуществления несколько доз антитела к PcrV (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к PcrV и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому

аспекту настоящего изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к PcrV, описанного в данном документе. Используемое в данном документе выражение "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к PcrV вводят субъекту в отдельный момент времени, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к PcrV, затем одной или более вторичных доз антитела к PcrV, а затем необязательно одной или более третичных доз антитела к PcrV.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к PcrV, раскрытого в данном документе. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также обозначается как "исходная доза"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальной, вторичной и третичной доз могут содержать одинаковое количество антитела к PcrV, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако в определенных вариантах осуществления количества антитела к PcrV, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, при необходимости корректируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводятся в начале режима лечения в качестве "нагрузочных доз" с последующим введением последующих доз, которые вводятся с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

В определенных иллюстративных вариантах осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят в течение периода времени от 1 до 48 ч (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает, в контексте последовательности из нескольких введений, дозу антитела к PcrV, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных введений доз.

Способы могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела к PcrV. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В определенных вариантах осуществления частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать на протяжении схемы лечения. Врач может корректировать частоту введения в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

#### Фармацевтические композиции

В данном документе предусмотрены фармацевтические составы, содержащие одно или более антител к PcrV в соответствии с табл. 1 и включающие, например, один или более (например, 1, 2 или 3) их компонентов, смешанных с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и U.S. Pharmacopoeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984). Способы получения такого фармацевтического состава, включающие смешивание фармацевтически приемлемого носителя или вспомогательного вещества с компонентом(ами), составляют часть настоящего изобретения, как и фармацевтические композиции, получаемые такими способами.

Объем настоящего изобретения включает высушенные, например, лиофилизованные, антитела к PcrV по настоящему изобретению и фармацевтическую композицию на их основе, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, но по сути не содержит воду. В одном варианте осуществления фармацевтический состав является водным (содержит воду). В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический состав является стерильным.

Фармацевтические составы на основе терапевтических средств можно получить путем смешивания с приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в виде, например, лиофилизованных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.).

Способ введения фармацевтических композиций, содержащих антитела к PcrV, может варьироваться. Пути введения включают пероральный, ректальный, чресслизистый, внутрикишечный, парентераль-

ный; внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой интравентрикулярный, внутривенный, внутривнутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсуффляционный, местный, кожный, трансдермальный или внутриартериальный.

В настоящем изобретении предусмотрены способы введения фармацевтических составов, содержащих антитело к PcrV, субъекту (например, человеку), включающие введение состава в организм субъекта, например в вену, подкожно-жировую клетчатку или мышечную ткань субъекта. Например, способ включает прокалывание тела субъекта иглой шприца и инъектирование состава в организм субъекта.

В данном документе предусмотрены одна или более емкостей (например, пластиковый или стеклянный флакон, например, с крышкой, или хроматографическая колонка, полая игла или цилиндрический шприц), содержащих антитело к PcrV, раскрытое в данном документе, или фармацевтическую композицию на его основе, содержащую фармацевтически приемлемый носитель. Предусмотрены способы получения одной или более емкостей, содержащих композицию, при этом способы включают введение компонентов комбинации в одну или более емкостей, например, в одну емкость, содержащую комбинацию компонентов, которые составлены вместе. В варианте осуществления настоящего изобретения емкость(и) затем включают в набор.

Также предусмотрены устройство, например, устройство для инъекций, содержащее антитело к PcrV, раскрытое в данном документе, или фармацевтическую композицию на его основе, и способы его применения. Устройство для инъекций представляет собой устройство, с помощью которого вещество вводят в организм пациента парентеральным путем, например, внутримышечно, подкожно или внутривенно. Например, устройство для инъекций может представлять собой шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, такой как автоинъектор, или заполняемый в момент применения, например, пользователем или врачом), который, например, содержит цилиндр или корпус для удержания жидкости, подлежащей инъекции (например, содержащей антитело или фрагмент или фармацевтическую композицию на их основе), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости; а также поршень для выталкивания жидкости из цилиндра через отверстие иглы.

Фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, можно также вводить с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций; такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 6620135; 6096002; 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Такие безыгольные устройства и способы их применения, предусматривающие фармацевтическую композицию, также являются частью настоящего изобретения.

В данном документе предусмотрены способы получения одного или более устройств для инъекций (например, предварительно заполненного шприца или автоинъектора), содержащих антитело к PcrV, при этом способы включают введение компонентов комбинации в одно или более таких устройств, например, в одно устройство, содержащее антитело к PcrV. В одном варианте осуществления устройство(а) для инъекций затем включают в набор.

Также предусмотрены наборы, содержащие антитело к PcrV. В одном варианте осуществления набор включает антитело в емкости или инъекционном устройстве (например, предварительно заполненном шприце или автоинъекторе). Набор может включать листок-вкладыш в упаковке, содержащий информацию относительно фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и врачам эффективно и безопасно применять содержащиеся там фармацевтические композиции. Например, любая из следующей информации, касающейся антител, предусмотренных в данном документе, может предоставляться во вкладыше: фармакокинетические параметры, фармакодинамические параметры, клинические исследования, параметры эффективности, показания к применению, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, побочные реакции, передозировка, надлежащая дозировка и введение, форма выпуска, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/распространителе и патентная информация.

#### Пути применения антител в диагностике

Антитела к PcrV, предусмотренные в данном документе, могут применяться для обнаружения и/или измерения содержания *P. aeguginosa* в образце, например, для диагностических целей. В некоторых вариантах осуществления рассматривается использование одного или более антител, предусмотренных в данном документе, в анализах для выявления заболевания или нарушения, такого как инфекция, вызванная *P. aeguginosa*. Иллюстративные диагностические анализы для *P. aeguginosa* могут включать, например, приведение полученного от пациента образца в контакт с антителом к PcrV по настоящему изобретению, где антитело к PcrV мечено детектируемой меткой или репортерной молекулой, или используется в качестве захватывающего лиганда для селективного выделения *P. aeguginosa* из образцов пациента. В качестве альтернативы, немеченое антитело к PcrV можно применять в диагностических путях применения в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченым с обеспечением обнаружения. Детектируемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоактивный изотоп, такой как <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, или <sup>125</sup>I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, P-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения содержания *P. aeguginosa* в образце, включают твердофазный иммуно-

ферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS).

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах, связанных с *P. aeruginosa*, в соответствии с настоящим изобретением, включают образец любой ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит поддающиеся обнаружению количества либо *P. aeruginosa*, либо ее фрагментов в нормальном или патологическом состояниях. Как правило, уровни *P. aeruginosa* в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания, связанного с *P. aeruginosa*, будут измеряться для начального определения исходного уровня или стандартного уровня *P. aeruginosa*. Затем данный исходный уровень *P. aeruginosa* можно сравнивать с уровнями *P. aeruginosa*, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие или имеющих связанное с *P. aeruginosa* состояние или симптомы, связанные с таким состоянием.

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

### Примеры

Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов средней квалификации в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции, предусмотренные в данном документе, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

#### Пример 1. Получение антител к PcrV.

ДНК, кодирующую полноразмерный PcrV или усеченную версию PcrV (PcrV 136-257), клонировали в целевые векторы для экспрессии в *E.coli* BL21(DE3). Рекомбинантный PcrV или усеченный вариант PcrV (PcrV 136-257) очищали из супернатантов лизатов трансформированных клеток *E.coli*. Человеческие антитела к PcrV получали с использованием полноразмерного белка PcrV.6xHis (см. также GenBank NP250397.1; штамм PAO1; GenScript; см. также SEQ ID NO: 77) или усеченного белка PcrV.6xHis (см. PcrV\_136-257; GenScript, см. также SEQ ID NO: 79). Иммуноген вводили непосредственно, с адьювантом для стимуляции иммунного ответа мыши VELOCIMMUNE® (т.е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека), например как описано в патенте США № 8502018. Иммунный ответ антител отслеживали с помощью специфического в отношении PcrV иммуноанализа. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, антитела к PcrV выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, специально включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. С помощью данного способа получали несколько полностью человеческих антител к PcrV (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами).

Иллюстративные антитела, полученные в соответствии с вышеуказанными способами, обозначали следующим образом: H1H29329P, H1H29332P, H1H29336P и H1H29339P.

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

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепей выбранных антител к PcrV по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2. В табл. 3 предусмотрены идентификаторы последовательностей для полноразмерных аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей.

Таблица 1

## Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H29329P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H29332P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H29336P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H29339P	50	52	54	56	58	60	62	64

Таблица 2

## Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H29329P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H29332P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H29336P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H29339P	49	51	53	55	57	59	61	63

Таблица 3

## Идентификаторы последовательности для полноразмерных последовательностей тяжелой и легкой цепей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:	
	Полноразмерная тяжелая цепь	Полноразмерная легкая цепь
	Аминокислота	Аминокислота
H1H29329P	65	66
H1H29332P	67	68
H1H29336P	69	70
H1H29339P	71	72

В данном документе антитела обычно называются в соответствии со следующей номенклатурой: после префикса, обозначающего Fc (например, "H4H"), следует числовой идентификатор (например, "13290", "13291", "13295" и т.д.), за которым следует суффикс "P", как показано в табл. 1, 2 и 3. Таким образом, в соответствии с данной номенклатурой в данном документе антитело может называться, например, "H1H29329P", "H1H29332P", "H1H29336P" и т.д. Используемые в данном документе префиксы в обозначениях антител указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. В частности, антитело "H1H" содержит Fc IgG1 человека (все вариабельные области являются полностью человеческими, на что указывает первая буква 'H' в обозначении антитела). Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc другого изотипа (например, антитело с Fc из IgG1 мыши можно превращать в антитело с Fc из IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (в том числе CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1-3, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания будут идентичными или по сути сходными независимо от природы Fc-домена.

## Антитела сравнения

Первое антитело сравнения, REGN3514 (контроль I, HC/LC SEQ ID NO: 73/74), представляет собой антитело к PcrV, последовательности которого описаны в WO 2013/070615. Второе антитело сравнения, REGN3977 (контроль III, HC/LC SEQ ID NO: 75/76), представляет собой антитело к PcrV, последовательности которого впервые описаны в US 7494653. Третье антитело сравнения к PcrV представляет собой REGN7070 (контроль V, HC/LC SEQ ID NO: 83/84). Антитела изотипического контроля REGN1932 и REGN684 (контроли II и IV соответственно) используют в экспериментах, приведенных ниже.

Пример 3. Полученные с помощью Viacore значения аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител к PcrV человека.

Константу равновесной диссоциации ( $K_D$ ) для разных PcrV-реагентов, связывающихся с очищенными моноклональными антителами к PcrV, определяли с применением Viacore T200 на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания проводили в подвижном буфере, состоящем из 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA и 0,05% об./об. Tween-20, pH

7,4 (HBS-EP) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали путем связывания амина со специфическим поликлональным антителом к Fc $\gamma$  человека (Jackson ImmunoResearch № по кат. 109-005-098) для захвата моноклональных антител к PcrV. Исследования связывания проводили для различных концентраций полноразмерного PcrV.6xhis (SEQ ID NO: 78) и PcrV (aa136-257).6xhis (SEQ ID NO: 80) (90 нМ-3,33 нМ; 3-кратное серийное разведение), полученных в подвижном буфере HBS-EP. Белки вводили на поверхность захваченного моноклонального антитела к PcrV в течение 4 мин при скорости потока, составляющей 50 мкл/минута, при этом диссоциацию реагента PcrV, связанного моноклональными антителами, контролировали в течение 10 мин в подвижном буфере HBS-EP.

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и скорости диссоциации ( $k_d$ ) определяли посредством аппроксимации сенсограмм в реальном времени по модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимации кривой Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и полупериоды диссоциации ( $t^{1/2}$ ) рассчитывали исходя из кинетических констант скоростей следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t^{1/2} (\text{мин.}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Кинетические параметры связывания для связывания полноразмерного PcrV.6xhis и PcrV (aa136-257).6xhis с моноклональными антителами к PcrV при 25°C и 37°C показаны в табл. 4-7.

Таблица 4

Кинетика связывания mAb к PcrV с полноразмерным PcrV.6xhis при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 90 нМ Ag (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (M)	$t^{1/2}$ (мин)
H1H29336P	283,9±2,2	102,1	4,90E+05	≤1,00E-05	2,04E-11	≥ 1155
H1H29339P	364,7±4,5	140,4	3,65E+05	≤1,00E-05	2,74E-11	≥ 1155
H1H29332P	504,4±2,8	151,9	2,37E+05	1,30E-05	5,48E-11	888,5
H1H29329P	438,4±2,3	81	1,84E+05	9,50E-04	5,16E-09	12,2
REGN3977 – контроль III	498,9±2,5	146,4	2,07E+05	4,95E-04	2,39E-09	23,4
REGN3514 – контроль I	618,6±4,9	169,4	2,67E+05	3,90E-05	1,46E-10	296,2
REGN1932 - изотипический контроль II	262,2±0,4	-5,9	NB	NB	NB	NB

Таблица 5

Кинетика связывания mAb к PcrV с полноразмерным PcrV.6xhis при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 90 нМ Ag (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (M)	$t^{1/2}$ (мин)
H1H29336P	272,5±1,4	80,7	8,60E+05	≤1,00E-05	1,16E-11	≥ 1155
H1H29339P	370,8±4,4	129,6	5,08E+05	≤1,00E-05	1,97E-11	≥ 1155
H1H29332P	533,4±2,1	163,2	2,93E+05	2,68E-05	9,20E-11	431,5
H1H29329P	430,7±1,8	59,6	5,54E+05	5,05E-03	9,12E-09	2,3
REGN3977 – контроль III	452,5±3,0	135,7	2,63E+05	9,17E-04	3,48E-09	12,6
REGN3514 – контроль I	517,6±2,9	141,2	4,31E+05	1,96E-04	4,53E-10	59,1
REGN1932 – изотипический контроль II	230,4±0,5	-22,5	NB	NB	NB	NB

Таблица 6

Кинетика связывания mAb к PcrV с PcrV (aa136-257).6xhis при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 90 нМ Ag (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H29336P	287,6±1,5	48,2	3,67E+05	1,48E-05	4,08E-11	783,1
H1H29339P	370,9±3,3	62,9	2,93E+05	2,76E-05	9,55E-11	418
H1H29332P	505,4±1,2	68,5	1,33E+05	3,83E-05	2,85E-10	302
H1H29329P	431,6±1,1	27,5	1,53E+05	2,30E-03	1,50E-08	5
REGN3977 – контроль III	497,7±2,6	66,6	2,23E+05	9,56E-04	4,28E-09	12,1
REGN3514 – контроль I	614,9±3,9	75,2	1,47E+05	1,22E-04	8,30E-10	94,7
REGN1932 – изотипический контроль II	262,4±0,3	0,4	NB	NB	NB	NB

Таблица 7

Кинетика связывания mAb к PcrV с PcrV (aa136-257).6xhis при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связано 90 нМ Ag (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H29336P	270,2±0,7	40,1	5,44E+05	4,36E-05	8,09E-11	264,7
H1H29339P	364,9±4,7	55,3	4,35E+05	8,15E-05	1,86E-10	141,8
H1H29332P	530,4±1,9	69,4	1,78E+05	1,06E-04	5,95E-10	109,2
H1H29329P	421,7±3,6	16,4	1,03E+05	1,10E-02	1,07E-07	1
REGN3977 Контроль III	445,8±2,6	54,7	2,16E+05	2,45E-03	1,14E-08	4,7
REGN3514 - контроль I	517,3±1,7	60,7	2,46E+05	5,96E-04	2,42E-09	19,4
REGN1932 - Изотипический контроль II	229,0±1,5	-3	NB	NB	NB	NB

При 25°C моноклональные антитела к PcrV связывались с полноразмерным PcrV.6xhis (SEQ ID NO: 78) со значениями  $K_D$  в диапазоне от 20,4 пМ до 5,16 нМ, как показано в табл. 4. При 37°C моноклональные антитела к PcrV связывались с полноразмерным PcrV.6xhis (SEQ ID NO: 78) со значениями  $K_D$  в диапазоне от 11,6 пМ до 9,12 нМ, как показано в табл. 5. Антитело изотипического контроля REGN1932 (контроль II) не проявляло связывания.

При 25°C моноклональные антитела к PcrV связывались с PcrV (aa136-257).6xhis (SEQ ID NO: 80) со значениями  $K_D$  в диапазоне от 40,8 пМ до 15,0 нМ, как показано в табл. 6. При 37°C моноклональные антитела к PcrV связывались с PcrV (aa136-257).6xhis (SEQ ID NO: 80) со значениями  $K_D$  в диапазоне от 80,9 пМ до 107 нМ, как показано в табл. 7. Антитело изотипического контроля REGN1932 (контроль II) не проявляло связывания.

Пример 4. Перекрестная конкуренция в анализе Octet между моноклональными антителами к PcrV.

Конкуренцию за связывание для панели антител к PcrV определяли с применением анализа методом безметочной биослойной интерферометрии в режиме реального времени на платформе биосенсора Octet® НТХ (ForteBio, подразделение Pall Life Sciences). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, содержащем 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20 и 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT), при встряхивании планшета при 1000 об./мин. Наконечники биосенсора Octet (ForteBio Inc, № 18-5122), покрытые антителом к пента-His, погружали на 90 с в лунки, содержащие раствор с концентрацией 20 мкг/мл полноразмерного PcrV с С-концевой гексагистидиновой меткой (PcrV.6xhis; SEQ ID: 78) для захвата ~0,62-0,74 нМ PcrV.6xhis. Затем наконечники биосенсора с захваченным антигеном насыщали первым моноклональным антителом к PcrV (впоследствии называемым mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие раствор с концентрацией 50 мкг/мл mAb-1, на 5 мин. Чтобы оценить, способны ли 2 антитела конкурировать за связывание со своими соответствующими эпитопами, наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие раствор второго моноклонального антитела к PcrV (впоследствии называемого mAb-2) с концентрацией 50 мкг/мл, на 3 минуты. Наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-EBT между всеми стадиями эксперимента. Мониторинг ответа связывания в реальном времени осуществляли в течение всего эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Сравнивали ответ связывания mAb-2 с предварительно полученным комплексом полноразмерного PcrV.6xhis и mAb-1 и определяли характер конкурентного/неконкурентного связывания различных антител к PcrV, как показано в табл. 8.

Таблица 8  
Перекрестная конкуренция антител к PcrV  
за связывание с полноразмерным PcrV.6xhis

Первое mAb-1, захваченное с применением биосенсоров Octet АНС	Антитела mAb-2, которые, как показано, конкурируют с mAb-1
H1H29339P	H1H29329P
	H1H29332P
	H1H29336P
	REGN3514
H1H29329P	H1H29339P
	H1H29332P
	H1H29336P
	REGN3514
H1H29332P	H1H29339P
	H1H29329P
	H1H29336P
	REGN3514
H1H29336P	H1H29339P
	H1H29329P
	H1H29332P
	REGN3514
REGN3514 - контроль I	H1H29339P
	H1H29329P
	H1H29332P
	H1H29336P

Пример 5. Связывание человеческих моноклональных антител с рекомбинантными белками PcrV P. Aeguginosa, измеренное с помощью ELISA.

Моноклональные антитела к PcrV (mAb) оценивали с помощью ELISA на их способность связываться с рекомбинантными белками PcrV. 96-луночные планшеты Nunc Micro Sorp™ покрывали с помощью 0,2 мкг на лунку рекомбинантного полноразмерного PcrV P. aeguginosa (GenScript) (SEQ ID NO: 77) или усеченной формы белка (охватывающей аминокислоты 136-233 зрелого белка; GenScript) (SEQ ID NO: 81) и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующее утро планшеты три раза промывали с помощью промывочного буфера (забуференного имидазолом солевого раствора с Tween-20) и блокировали в течение 1,5 часа при 25°C с помощью 200 мкл блокирующего буфера (3% BSA в PBS). Планшеты промывали один раз, добавляли титры антител и антитела изотипически сходного контроля (варьирующие от 33 нМ до 0,1 пМ с серийными разбавлениями 1:3 в 0,5% BSA/0,05% Tween-20/PBS) в лунки, содержащие белок, и инкубировали в течение одного часа при 25°C. Лунки промывали три раза, а затем инкубировали с 100 нг/мл конъюгированного с HRP вторичного антитела к HRP человека на лунку в течение одного часа при 25°C. Добавляли 100 мкл хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ ELISA Pico в каждую лунку и выявляли сигнал (устройство для считывания планшетов Victor X3, Perkin Elmer). Значения люминесценции анализировали с помощью четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой ответа (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 9, все антитела к PcrV демонстрировали связывание с полноразмерным PcrV P. aeguginosa при субнаномолярных EC<sub>50</sub> и связывание с усеченным белком PcrV при субнаномолярных EC<sub>50</sub>. Связывание антитела сравнения к PcrV (контроль I - REGN3514) при субнаномолярных EC<sub>50</sub> наблюдали как с полноразмерным белком PcrV, так и с усеченным белком PcrV, в то время как mAb изотипического контроля (контроль IV - REGN684) не связывалось ни с одним белком.

Таблица 9  
Связывание mAb к PcrV с белками PcrV P. aeguginosa

mAb	Связывание (EC <sub>50</sub> ) [M]	
	Полноразмерный PcrV	PcrV 136-233
H1H29329P	5,969E-10	7,438E-09
H1H29332P	2,119E-09	8,139E-10

H1H29336P	2,276E-09	1,027E-09
H1H29339P	1,961E-09	8,562E-10
Контроль I – REGN3514	6,957E-10	7,587E-09
Контроль IV – изотипический контроль	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

Пример 6. Способность моноклональных антител к PcrV *P. aeruginosa* нейтрализовать цитотоксичность, опосредованную PcrV.

Моноклональные антитела к PcrV оценивали на предмет их способности предотвращать опосредованный PcrV лизис клеток A549, линии эпителиальных клеток легких человека. Клетки A549 высевали с плотностью примерно  $4,8 \times 10^5$  клеток/мл в Ham's F-12K (с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS и L-глутамина) в черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном, обработанные культурой ткани, и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день среду удаляли из клеток и заменяли на 100 мкл среды для анализа (DMEM без фенолового красного, с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS). Титры очищенных антител или изотипически сходного контроля (варьирующие от 33,3 пМ до 1,33 мкМ) добавляли в 50 мкл и клетки инкубировали в течение 45 мин при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

Тем временем, штаммы 6077 (Gerald Pier, Brigham and Women's Hospital, Гарвардский университет) и ATCC 700888 (ATCC) *P. aeruginosa* в культурах в фазе логарифмического роста получали следующим образом: культуры *P. aeruginosa* в течение ночи выращивали в LB, разбавляли 1:50 свежим LB и выращивали до OD<sub>600</sub> = ~1 при 37°C со встряхиванием. Культуры промывали один раз PBS и разбавляли до OD<sub>600</sub> = 0,03 в PBS для обоих штаммов *P. aeruginosa*. Бактерии в 50 мкл порциях добавляли в лунки, содержащие клетки и антитела, инкубировали в течение двух часов при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Гибель клеток определяли с использованием набора для анализа CytoTox-Glo™ (Promega). Люминесценцию детектировали с использованием устройства для считывания планшетов (Victor, Perkin Elmer), и значения люминесценции анализировали с помощью четырехпараметрического логистического уравнения (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 10, mAb к PcrV (H1H29329P, H1H29332P, H1H29336P и H1H29339P) показали эффективность в предотвращении гибели клеток A549. Все четыре моноклональных антитела защищали от обоих штаммов *P. aeruginosa*. Контрольное mAb к PcrV (контроль I - REGN3514) также продемонстрировало эффективность против обоих бактериальных штаммов, и mAb изотипического контроля (контроль II) не показало какого-либо эффекта.

Таблица 10  
Нейтрализация опосредованной PcrV токсичности *P. aeruginosa* в анализе цитотоксичности A549

mAb	Анализ цитотоксичности A549 (IC50) [M]	
	Штамм <i>P. aeruginosa</i> 6077	Штамм <i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888
H1H29329P	1,079E-08	5,428E-08
H1H29332P	6,474E-09	3,288E-08
H1H29336P	8,400E-10	6,372E-09
H1H29339P	3,329E-11	7,818E-09
Контроль I – REGN3514	8,070E-10	1,784E-08
Контроль II – изотипический контроль	Отсутствие эффективности	Отсутствие эффективности

Пример 7. Способность моноклональных антител к PcrV *P. aeruginosa* нейтрализовать цитотоксичность, опосредованную PcrV.

Моноклональные антитела к PcrV оценивали на предмет их способности предотвращать опосредованный PcrV лизис эритроцитов кролика (эритроциты; Colorado Serum Co.).

Инкубированные в течение ночи штамм 6077 и штамм ATCC 700888 *P. aeruginosa* выращивали в LB, разбавляли 1:50 свежим LB и выращивали до OD<sub>600</sub> = ~1 при 37°C со встряхиванием. Культуру один раз промывали с помощью PBS и разбавляли до OD<sub>600</sub> = 0,15 в PBS для обоих штаммов *P. aeruginosa*. rRBC получали центрифугированием 50% суспензии rRBC при 4°C в течение 10 мин при 2000×g, заменяя супернатант с помощью PBS, осторожно смешивая rRBC и PBS и разбавляя rRBC до 5%. В 96-луночных круглодонных планшетах 10 мкл штамма 6077 или ATCC 700888 *P. aeruginosa* смешивали с титрами очищенных антител или изотипически сходного контроля (варьирующими от 33,3 пМ до 1,33 мкМ) или Triton X-100 (положительный контроль лизиса) в 50 мкл с последующим добавлением 50 мкл 5% эритроцитов. Планшеты инкубировали при 37°C в течение двух часов, встряхивая при

550 об./мин. В конце инкубационного периода планшеты центрифугировали при 25°C в течение одной минуты при 200×g, 75 мкл супернатанта переносили на планшет с плоским прозрачным дном и определяли поглощение ( $A_{405}$ ) с помощью устройства для считывания планшетов (Victor X3, Perkin Elmer), и значения оптической плотности анализировали с помощью четырехпараметрического логистического уравнения (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 11, все четыре mAb к PcrV показали эффективность в предотвращении гемолиза rRBC и защищали от обоих штаммов *P. aeruginosa*. Контрольное mAb к PcrV (контроль I - REGN3514) также продемонстрировало эффективность против обоих бактериальных штаммов, и mAb изотипического контроля (контроль IV - REGN684) не показало какого-либо эффекта.

Таблица 11

Нейтрализация PcrV *P. aeruginosa* в анализе гемолиза эритроцитов кролика

mAb	Анализ гемолиза эритроцитов кролика (IC50)	
	[M]	
	Штамм 6077 <i>P. aeruginosa</i>	Штамм <i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888
H1H29329P	5,640E-08	2,389E-09
H1H29332P	1,525E-08	4,062E-09
H1H29336P	2,051E-10	8,097E-10
H1H29339P	2,302E-09	5,586E-09
Контроль I – REGN3514	2,441E-09	1,011E-09
Контроль IV – изотипический контроль	Отсутствие эффективности	Отсутствие эффективности

Пример 8. Эффективность моноклональных антител к PcrV на модели острой пневмонии *in vivo*.

Моноклональные антитела (mAb) к PcrV, которые предотвращают опосредованную PcrV токсичность либо в анализе гемолиза эритроцитов (RBC) кролика (пример 7), либо в анализе цитотоксичности A549 (пример 6), оценивали на предмет их способности предотвращать смертность в мышиную модель острой пневмонии. Самкам мышей BALB/c-ELITE (Charles River; возраст 7-8 недель; n=5 на группу) вводили подкожно однократную дозу 5 мг/кг очищенных антител или изотипически сходного контроля. Через два дня после инъекции mAb мышам интраназально вводили 20 мкл либо штамма 6077 ( $\sim 4,2 \times 10^5$  КОЕ/мышь), либо штамма 6206 ( $\sim 1,2 \times 10^6$  КОЕ/мышь) *P. aeruginosa*, которые были выращены до логарифмической фазы ( $OD_{600} = 1$ ) в TSB при 37°C, промывали один раз и ресуспендировали в PBS. Выживаемость мышей наблюдали в течение семи дней после заражения.

Как показано в табл. 12, все четыре mAb к PcrV, H1H29329P, H1H29332P, H1H29336P и H1H29339P, предотвращали гибель мышей в модели острой пневмонии при профилактическом введении в дозе 5 мг/кг, защищая от обоих штаммов *P. aeruginosa*. Контрольное mAb к PcrV (контроль I - REGN3514) также продемонстрировало эффективность против обоих бактериальных штаммов. mAb изотипического контроля (контроль IV - REGN684) не показало защитного действия.

Таблица 12

Профилактическая обработка моноклональными антителами к PcrV в модели острой пневмонии

mAb	% выживаемости (день 7 после заражения)	
	Штамм 6077 <i>P. aeruginosa</i>	Штамм 6206 <i>P. aeruginosa</i>
H1H29329P	100	100
H1H29332P	100	100
H1H29336P	100	100
H1H29339P	100	100
Контроль I – REGN3514	100	100
Контроль IV – REGN684	0	0

Пример 9. Эффективность *in vivo* моноклональных антител к PcrV в модели острой пневмонии с использованием штаммов 6077 и 6206 *P. aeruginosa*.

Моноклональные антитела (mAb) к PcrV, которые продемонстрировали эффективность в мы-

шиной модели острой пневмонии при профилактическом введении в дозе 5 мг/кг (Н1Н29329Р, Н1Н29332Р, Н1Н29336Р, Н1Н29339Р), тестировали при более низких дозах для оценки их способности предотвращать смертность в мышинной модели острой пневмонии. Самкам мышей BALB/c-ELITE (Charles River; возраст 7-8 недель; n=5-10 на группу) вводили подкожно однократную дозу 1,0, 0,2 или 0,04 мг/кг очищенных антител или изотипически сходного контроля. Через два дня после инъекции mAb мышам интраназально вводили 20 мкл штамма 6077 ( $\sim 4,5 \times 10^5$  КОЕ/мышь) или штамма 6206 ( $\sim 9 \times 10^5$  КОЕ/мышь) *P. aeruginosa*, которые были выращены до логарифмической фазы ( $OD_{600} = 1$ ) в TSB при 37°C, промывали один раз и ресуспендировали в PBS. Выживаемость мышей наблюдали в течение семи дней после заражения.

Как показано в табл. 13, mAb к PcrV Н1Н29336Р и Н1Н29339Р снижали смертность мышей при профилактическом введении в таких низких дозах, как 0,04 мг/кг для штамма 6077 *P. aeruginosa* и в таких низких дозах, как 0,2 мг/кг для штамма 6206 *P. aeruginosa*. Напротив, mAb к PcrV Н1Н29329Р и Н1Н29332Р не смогли предотвратить смертность при тестировании в дозах менее 1,0 мг/кг с использованием более цитотоксического штамма 6206. Контрольное mAb к PcrV (контроль I - RENG3514) теряло эффективность против штаммов 6077 и 6206 *P. aeruginosa* при дозах менее 0,2 мг/кг и 1,0 мг/кг соответственно. mAb изотипического контроля (контроль IV - REGN684) не показало защитного действия.

Таблица 13

Профилактическая обработка моноклональными антителами к PcrV  
в мышинной модели острой пневмонии

mAb	Доза mAb (мг/кг)	% выживаемости (день 7 после заражения)	
		Штамм 6077 <i>P. aeruginosa</i>	Штамм 6206 <i>P. aeruginosa</i>
Н1Н29329Р	1	100	80
	0,2	н.д.	0
	0,04	н.д.	н.д.
Н1Н29332Р	1	100	80
	0,2	н.д.	0
	0,04	н.д.	н.д.
Н1Н29336Р	1	100	80
	0,2	100	80
	0,04	70	0
Н1Н29339Р	1	100	80
	0,2	100	90
	0,04	60	0
RENG3514 – контроль I	1	100	40
	0,2	80	0
	0,04	0	0
Контроль IV – изотипический контроль	1	20	0
	0,2	0	0
	0,04	н.д.	н.д.

н.д.: нет данных (эксперимент не проводили)

Пример 10. Эффективность *in vivo* профилактической обработки с помощью моноклональных антител к PcrV в модели острой пневмонии с использованием штамма 6206 *P. aeruginosa*.

Этот пример продемонстрировал способность профилактически вводимого моноклонального антитела к PcrV снижать бактериальную нагрузку в легких в мышинной модели острой пневмонии с использованием штамма 6206 *P. aeruginosa*.

Антитело Н1Н29339Р к PcrV предотвращало смертность в мышинной модели острой пневмонии при профилактическом введении, как показано в примере 9. В этом эксперименте антитело тестировали в низких дозах на его способность уменьшать бактериальную нагрузку в легких мышей с использованием той же модели острой пневмонии. Самкам мышей BALB/c-ELITE (Charles River; возраст 7-8 недель; n=5 на группу) вводили подкожно однократную дозу 0,1 или 0,2 мг/кг очищенных антител или 0,2 мг/кг изотипически сходного контроля. Через два дня после инъекции антитела мышам интраназально вводили 20 мкл штамма 6206 ( $\sim 1,2 \times 10^6$  КОЕ/мышь) *P. aeruginosa*, который был выращен до логарифмической фазы ( $OD_{600} = 1$ ) в TSB при 37°C, промывали один раз и ресуспендировали в PBS. Мышей умерщвляли через 16-18 ч после инфицирования, легкие собирали и гомогенаты легких высевали для подсчета бактерий на чашках с агаром LB.

Как показано в табл. 14, mAb к PcrV Н1Н29339Р снижало бактериальную нагрузку в легких мышей, инфицированных *P. aeruginosa* 6206, на один log больше, чем mAb контроля к PcrV (контроль V - RENG7070) при введении в дозе 0,1 или 0,2 мг/кг, и на 3-4 log больше, чем в группах без антител или с mAb изотипического контроля (контроль IV).

Таблица 14

Бактериальная нагрузка в легких мышей, которым профилактически вводили 0,1 или 0,2 мг/кг mAb к PcrV в модели острой пневмонии с использованием штамма 6206 *P. aeruginosa*

mAb	Доза mAb (мг/кг)	<i>P. aeruginosa</i> 6206 в легких (КОЕ/г легких)
Н1Н29339Р	0,1	3,23e6
	0,2	1,10e5
Контроль V – REGN7070	0,1	2,03e7
	0,2	2,22e6
Контроль IV – изотипический контроль	0,2	1,21e9
Без mAb	н.п.	1,33e9

н.п. - не применимо

Пример 11. Эффективность *in vivo* профилактической обработки с помощью моноклональных антител к PcrV в модели острой пневмонии с использованием штамма PA01 *P. aeruginosa*.

Этот пример продемонстрировал способность профилактически вводимого моноклонального антитела к PcrV снижать бактериальную нагрузку в легких в мышинной модели острой пневмонии с использованием штамма PA01 *P. aeruginosa*, наиболее часто используемого штамма для исследований и менее цитотоксического, по сравнению с недавно выделенными штаммами *P. aeruginosa*.

Антитело Н1Н29336Р к PcrV продемонстрировало эффективность в мышинной модели острой пневмонии при профилактическом введении против цитотоксических штаммов 6077 и 6206 *P. aeruginosa*, как показано в примерах 8-10. В данном примере антитело тестировали против нецитотоксического штамма PA01. Самкам мышей BALB/c-ELITE (Charles River; возраст 7-8 недель; n=10 на группу) вводили подкожно однократную дозу 25 мг/кг очищенных антител или изотипически сходного контроля. Через два дня после инъекции mAb мышам интраназально вводили 20 мкл штамма PA01 (~1×10<sup>8</sup> КОЕ/мышь) *P. aeruginosa*, который был выращен до логарифмической фазы (OD<sub>600</sub> = 1) в TSB при 37°C, промывали один раз и ресуспендировали в PBS. Мышей умерщвляли через 16-18 ч после инфицирования, легкие собирали и гомогенаты легких высевали для подсчета бактерий на чашках с агаром LB.

Как показано в табл. 15, mAb к PcrV Н1Н29336Р снижало бактериальную нагрузку в легких мышей, инфицированных нецитотоксическим штаммом PA01 *P. aeruginosa*, примерно на 2 log больше, чем mAb контроля к PcrV (контроль V - REGN7070), и на 4 log больше, чем в группах без антител или с mAb изотипического контроля (контроль IV).

Таблица 15

Бактериальная нагрузка в легких мышей, которым профилактически вводили 25 мг/кг mAb к PcrV в модели острой пневмонии с использованием штамма PA01 *P. aeruginosa*

mAb	Доза mAb (мг/кг)	<i>P. aeruginosa</i> PA01 в легких (КОЕ/г легких)
Н1Н29336Р	25	5,11e7
Контроль V – REGN7070	25	1,24e9
Контроль IV – изотипический контроль	25	9,34e11
Без mAb	н.п.	2,34e11

н.п. - не применимо

Пример 12. Связывание эпитопов антителами к PcrV, оцененное с помощью HDX-MS.

Водородно-дейтериевый обмен, выявляемый посредством масс-спектрометрии (HDX-MS) проводили для определения аминокислотных остатков PcrV *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 78), взаимодействующих с антителами Н1Н29336Р и Н1Н29339Р. Общее описание способа HDX-MS приведено, например, в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Эксперименты HDX-MS проводили на интегрированной платформе HDX-MS, состоящей из системы Leaptac HDX PAL для мечения дейтерием и тушения, Waters Acquity M-Class (вспомогательной системы управления растворителями) для расщепления и загрузки образцов, Waters Acquity M-Class (системы управления растворителями (xBinary)) для аналитического градиента и масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF для измерения массы пептидов.

Раствор для мечения получали как буфер PBS в D<sub>2</sub>O при рD 7,0 (10 мМ фосфатного буфера, 140 мМ NaCl и 3 мМ KCl, эквивалентно рН 7,4 при 25°C). Для мечения дейтерием 10 мкл PcrV (от GenScript,

57,3 мкМ) или PcrV, предварительно смешанного с H1H29336P в молярном соотношении 1:0,6 (комплекс антиген-антитело) и 10 мкл PcrV (от GenScript, 31,7 мкМ) или PcrV, предварительно смешанного с H1H29339P в молярном соотношении 1:0,6 (комплекс антиген-антитело) инкубировали при 20°C с 90 мкл раствора для мечения на основе D<sub>2</sub>O в различные моменты времени в двух повторностях (например, недеитерированный контроль = 0 секунд; мечение дейтерием в течение 5 мин и 10 мин). Реакцию дейтерирования гасили посредством добавления 100 мкл буфера для гашения (0,5 М ТСЕР-НСl, 8 М мочевины и 1% муравьиной кислоты) к каждому образцу в течение 5-минутной инкубации при 20°C. Затем подвергнутые гашению образцы вводили в Waters HDX Manager для расщепления пепсином/протеазой XIII в режиме реального времени. Расщепленные пептиды разделяли на колонке C8 (1,0 мм×50 мм, NovaBioassays) при -9,5°C с 22-минутным градиентом от 0% до 90% В (подвижная фаза А: 0,5% муравьиной кислоты и 4,5% ацетонитрила в воде, подвижная фаза В: 0,5% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали с помощью масс-спектрометрии Thermo Q Exactive HF в режиме LC-MS/MS или LC-MS.

Проводили поиск данных LC-MS/MS для образца недеитерированного PcrV в базе данных, содержащей последовательность PcrV и его обратную последовательность, с применением средства поиска Byonic (Protein Metrics). Параметры поиска устанавливали по умолчанию с применением неспецифического ферментативного расщепления и человеческого гликозилирования в качестве общей вариабельной модификации. Перечень идентифицированных пептидов затем импортировали в программное обеспечение HDX Workbench (версия 3.3) для расчета поглощения дейтерия каждым пептидом, выявленным с помощью LC-MS, из всех дейтерированных образцов. Для данного пептида массу центроида (зависимую от интенсивности средневзвешенную массу) в каждый момент времени использовали для расчета поглощения дейтерия (D) и процента поглощения дейтерия (% D).

$$\begin{array}{l} \text{Поглощение дейтерия} \\ \text{(поглощение D)} \end{array} = \frac{\text{Средняя масса (дейтерированный образец)} - \text{Средняя масса (недейтерированный образец)}}{\text{Средняя масса (недейтерированный образец)}}$$

$$\begin{array}{l} \text{Процент поглощения} \\ \text{дейтерия (\% D)} \end{array} = \frac{\text{Поглощение D для пептида в каждый момент} \\ \text{времени X 100\%}}{\text{Максимальное поглощение D для пептида}}$$

Всего 127 пептидов из PcrV идентифицировали как из PcrV отдельно, так и из PcrV в комплексе с образцами H1H29336P, что составляет 95% охвата последовательности PcrV. Любой пептид, который демонстрировал дифференциальное процентное значение поглощения D выше 5%, определяли как в значительной степени защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 155-170 (ALSAKQGIRIDAGGID - SEQ ID NO: 85) в PcrV, были в значительной степени защищены посредством H1H29336P (остатки PcrV пронумерованы в соответствии с аминокислотной последовательностью PcrV SEQ ID NO: 78). См. табл. 16.

Всего 133 пептида из PcrV идентифицировали как из PcrV отдельно, так и из PcrV в комплексе с образцами H1H29339P, что составляет 98% охвата последовательности PcrV. Любой пептид, который демонстрировал дифференциальное процентное значение поглощения D выше 5%, определяли как в значительной степени защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 150-170 (SQINAALSAKQGIRIDAGGID - SEQ ID NO: 86) в PcrV, были в значительной степени защищены посредством H1H29339P (остатки PcrV пронумерованы в соответствии с аминокислотной последовательностью PcrV SEQ ID NO: 78). См. табл. 17.

Таблица 16

Пептиды PcrV со значительной защитой при образовании комплекса  
PcrV-H1N29336P по сравнению с PcrV отдельно

PcrV	Заряд (+)	5 мин.			10 мин.			Δ% D
		PcrV- H1N2933 6P		PcrV ΔD	PcrV- H1N2933 6P		PcrV ΔD	
		Центроид MH <sup>+</sup>	Центро ид MH <sup>+</sup>		Центроид MH <sup>+</sup>	Центро ид MH <sup>+</sup>		
155-165	2	1173,10	1173,74	-0,64	1172,99	1173,80	0,81	<b>-9,0</b>
155-170	2	1587,45	1588,32	-0,87	1587,37	1588,34	0,97	<b>-7,3</b>
155-170	3	1587,59	1588,30	-0,70	1587,50	1588,29	0,79	<b>-5,9</b>
157-165	2	988,46	988,91	-0,45	988,35	988,91	0,55	<b>-8,0</b>
157-170	3	1402,70	1403,25	-0,55	1402,61	1403,22	0,61	<b>-5,4</b>
157-170	2	1402,78	1403,33	-0,55	1402,68	1403,25	0,57	<b>-5,2</b>
161-165	1	573,12	573,29	-0,17	573,08	573,28	0,20	<b>-6,8</b>
161-170	2	987,44	987,80	-0,36	987,38	987,75	0,37	<b>-5,1</b>

Таблица 17

Пептиды PcrV со значительной защитой при образовании комплекса  
PcrV-H1N29339P по сравнению с PcrV отдельно

PcrV	Заряд (+)	5 мин.			10 мин.			Δ% D
		PcrV- H1N2933 9P		PcrV ΔD	PcrV- H1N2933 9P		PcrV ΔD	
		Центроид MH <sup>+</sup>	Центро ид MH <sup>+</sup>		Центроид MH <sup>+</sup>	Центр оид MH <sup>+</sup>		

150-156	1	716,24	716,46	-0,22	716,23	716,63	0,40	-6,8
						1173,9	-	-
155-165	2	1172,94	1173,78	-0,84	1172,84	1	1,07	11,8
						1588,4	-	-
155-170	2	1587,22	1588,29	-1,07	1587,11	9	1,38	-9,7
						-	-	-
157-165	2	988,35	988,85	-0,50	988,25	988,95	0,70	-9,5
						1174,6	-	-
157-168	2	1173,96	1174,55	-0,59	1173,81	8	0,87	-8,1
						1403,4	-	-
157-170	2	1402,67	1403,30	-0,63	1402,46	3	0,97	-7,4
						-	-	-
161-165	1	573,07	573,28	-0,21	573,06	573,30	0,24	-8,3
						-	-	-
161-170	2	987,31	987,71	-0,40	987,17	987,79	0,62	-7,1

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, кроме описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PcrV *P. aeruginosa*, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую CDR легкой цепи (LCDR)1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

2. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют одну или более из следующих характеристик:

- представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- связываются с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при  $25^\circ\text{C}$ ;
- связываются с полноразмерным PcrV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее  $10^{-8}$  М, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при  $37^\circ\text{C}$ ;
- демонстрируют нейтрализацию штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно  $10^{-8}$  М в анализе цитотоксичности;
- демонстрируют нейтрализацию штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе цитотоксичности;
- демонстрируют нейтрализацию штамма 6077 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М в анализе бляшкообразования;
- демонстрируют нейтрализацию штамма ATCC 700888 *P. aeruginosa* с  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-7}$  М в анализе бляшкообразования;
- снижают смертность от штамма 6206 или штамма 6077 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 5 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;
- снижают смертность от штамма 6206 или штамма 6077 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 1,0, 0,2 или 0,04 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;
- снижают бактериальную нагрузку в легких штамма 6206 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 0,1 мг/кг или 0,2 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;
- снижают бактериальную нагрузку в легких штамма PA01 *P. aeruginosa* у мышей, профилактически обработанных 25 мг/кг, по сравнению с необработанными мышами в модели острой пневмонии;

(l) перекрестно конкурируют с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1;

(m) связываются с полноразмерным PcrV с EC<sub>50</sub> 2.276E-09;

(n) связываются с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81) с EC<sub>50</sub> 1.027E-09;

(o) взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (i) аминокислотных остатков от положения приблизительно 150 до положения приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и из (ii) аминокислотных остатков от положения приблизительно 155 до приблизительно 170 в SEQ ID NO: 78; и/или

(p) взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащие HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, содержащие LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с PcrV 136-233 (SEQ ID NO: 81).

6. Способ нейтрализации *P. aeruginosa*, при этом способ включает подвергание клетки, инфицированной *P. aeruginosa*, воздействию композиции, содержащей одно или более антител к PcrV или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп.1-5, где воздействие приводит к усиленной защите от гибели клеток.

7. Способ по п.6, где нейтрализацию *P. aeruginosa* осуществляют *in vitro* или *in vivo*.

8. Способ по п.6, где усиленная защита наблюдается, если антитело используют отдельно или если его используют в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или антителами к *P. aeruginosa*.

9. Способ по п.8, где одно или более дополнительных терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из антибиотика, противовоспалительного лекарственного средства, другого антитела к *P. aeruginosa* и терапевтического средства, применимого для лечения совместной инфекции.

10. Способ по п.9, где одно или более дополнительных терапевтических средств представляют собой терапевтическое средство, применимое для лечения совместной инфекции, и где совместная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную *S. aureus*.

11. Способ по п.8, где одно или более дополнительных терапевтических средств представляют собой другое антитело к *P. aeruginosa*.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая одно или более выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где одно или более выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 34/42.

14. Выделенная полинуклеотидная молекула, кодирующая варибельную область тяжелой цепи (HCVR) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с PcrV *P. Aeruginosa* по п.1.

15. Выделенная полинуклеотидная молекула, кодирующая варибельную область легкой цепи (LCVR) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с PcrV *P. Aeruginosa* по п.1.

16. Выделенная полинуклеотидная молекула, кодирующая варибельную область тяжелой цепи (HCVR) и варибельную область легкой цепи (LCVR) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с PcrV *P. Aeruginosa* по п.1.

17. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по любому из пп.14-16.

18. Выделенная клетка, экспрессирующая вектор по п.17.

19. Способ снижения риска заражения инфекцией *P. aeruginosa*, при этом способ включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 или фармацевтической композиции по п.12 или 13 субъекту с повышенным риском возникновения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

20. Способ по п.19, где субъект с повышенным риском возникновения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, выбран из группы, состоящей из субъекта, подвергающегося хирургической операции, субъекта, получающего лечение от серьезного заболевания, пациента с травмой, человека, употребляющего наркотики внутривенным путем, субъекта с тяжелыми ожогами, субъекта, использующего дыхательный аппарат, субъекта с катетером, субъекта, подвергающегося химиотерапии, субъекта с диабетом, субъекта с муковисцидозом, субъекта с туберкулезом, субъекта с ВИЧ или субъекта с ослабленной иммунной системой.

21. Способ снижения бактериальной нагрузки у субъекта с инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, при

этом способ включает введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 или фармацевтической композиции по п.12 или 13.

22. Способ увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, или субъекта с риском возникновения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, при этом способ включает введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 или фармацевтической композиции по п.12 или 13.

23. Способ облегчения или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты возникновения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 или фармацевтической композиции по п.12 или 13.

24. Способ по п.23, где по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, озноба, головной боли, усталости, боли в суставах, скованности, миалгии, диареи, рвоты, боли, зуда, выделения жидкости из ушей, высыпаний, заполненных гноем пустул на коже, боли в глазах, покраснения глаз, пневмонии, кашля, заложенности носа, выделения зеленого гноя со сладким фруктовым запахом из мягких тканей и инфекции мочевыводящих путей.

25. Способ по п.23, где фармацевтическую композицию вводят с профилактической или терапевтической целью нуждающемуся в этом субъекту.

26. Способ по п.23, где субъект выбран из группы, состоящей из субъекта, подвергающегося хирургической операции, субъекта, получающего лечение от серьезного заболевания, пациента с травмой, человека, употребляющего наркотики внутривенным путем, субъекта с тяжелыми ожогами, субъекта, использующего дыхательный аппарат, субъекта с катетером, субъекта, подвергающегося химиотерапии, субъекта с диабетом, субъекта с муковисцидозом, субъекта с туберкулезом, субъекта с ВИЧ или субъекта с ослабленной иммунной системой.

27. Способ по п.23, где нуждающийся в этом субъект имеет инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*.

28. Способ по п.23, где субъект подвержен риску заражения инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*.

29. Способ по п.27, где субъект имеет инфекцию, вызванную *S. aureus*.

30. Способ по любому из пп.19-29, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

31. Способ по п.30, где второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из антибиотика, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств) и другого антитела к *P. aeruginosa*.

32. Способ по любому из пп.19-29, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутримышечно, интраназально или перорально.

33. Способ по п.27, где субъект имеет пневмонию, бактериемию, инфекцию костей, инфекцию суставов, инфекцию кожи, ожоговую инфекцию, раневую инфекцию или любую их комбинацию.

34. Способ по п.27, где *P. aeruginosa* устойчива или частично устойчива к антибиотику.

35. Способ увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего муковисцидозом, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере одного антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 или фармацевтической композиции по п.12 или 13.

36. Способ по п.35, где у субъекта нет симптомов пневмонии на момент введения.

