

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048000**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.18**

**(21)** Номер заявки  
**202192923**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.04.30**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/42* (2006.01)  
*A61P 31/16* (2006.01)  
*C07K 16/10* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А**

---

**(31)** РСТ/ЕР2019/061134

**(32)** 2019.04.30

**(33)** ЕР

**(43)** 2022.02.16

**(86)** РСТ/ЕР2020/062160

**(87)** WO 2020/221908 2020.11.05

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ХУМАБС БИОМЕД СА (СН)**

**(72)** Изобретатель:  
**Корти Давиде, Бениньи Фабио (СН)**

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

**(56)** WO-A1-2017123685

JONATHAN ZALEVSKY ET AL.: "Enhanced antibody half-life improves in vivo activity", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 28, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 157-159, XP055395562, New York, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1601, page 157, right-hand column, paragraph 1, page 158, left-hand column, paragraph 1 EP-A1-3138853

KALLEWAARD NICOLE L. ET AL.: "Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 166, no. 3, 21 July 2016 (2016-07-21), pages 596-608, XP029667814, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2016.05.073

---

**(57)** В изобретении описаны антитела, которые нейтрализуют инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А. В изобретении описаны также нуклеиновые кислоты, которые кодируют указанные антитела, и иммортализованные В-клетки и культивируемые плазматические клетки, которые их продуцируют. Кроме того, в изобретении описано применение антител, предлагаемых в изобретении, для профилактики и лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

---

**B1**

**048000**

**048000 B1**

Изобретение относится к антителам, которые эффективно снижают инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А, и к применению указанных антител. В частности, изобретение относится к профилактике и лечению инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

Грипп представляет собой инфекционное заболевание, которое распространено во всем мире с ежегодными вспышками, вызывая в год примерно от трех до пяти миллионов случаев серьезной болезни и примерно от 290000 до 650000 смертей от респираторных заболеваний (WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 6 ноября 2018 г.). Наиболее распространенные симптомы включают: внезапное повышение температуры, кашель (обычно сухой), головную боль, мышечную и суставную боль, серьезный дискомфорт (плохое самочувствие), боль в горле и насморк. Период инкубации варьируется от одного до четырех дней, хотя, как правило, симптомы начинают проявляться примерно через два дня после контакта с вирусом. Осложнениями гриппа могут являться пневмония, синуситы и ухудшение имеющихся ранее проблем со здоровьем, таких как астма или сердечная недостаточность, сепсис или обострение хронических основных заболеваний.

Грипп вызывается вирусом гриппа, антигенно и генетически разнообразной группой вирусов семейства Orthomyxoviridae, геном которых представлен отрицательно полярной одноцепочечной сегментированной РНК. Из четырех типов вируса гриппа (А, В, С и D) три типа (А, В и С) поражают людей. Вирусы гриппа типа А представляют собой наиболее вирулентные патогены человека и вызывают наиболее серьезное заболевание. Вирусы гриппа А можно классифицировать на основе различных подтипов присутствующих основных поверхностных белков: гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА). Известно по меньшей мере 18 подтипов вируса гриппа А, которые определяются их белками гемагглютинаина ("НА"). НА можно подразделять на две группы. Группа 1 содержит подтипы H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 и H17, а группа 2 включает подтипы H3, H4, H7, H10, H14 и H15. В то время как все подтипы присутствуют в птицах, болезни у людей в основном вызываются подтипами H1, H2 и H3. Подтипы H5, H7 и H9 вызывают серьезные спорадические инфекции у людей и могут приводить к новой пандемии. Вирусы гриппа А постоянно эволюционируют, создавая новые варианты, это явление называют антигенным дрейфом. Как следствие, антитела, выработанные в ответ на последние вирусы, плохо защищают или вообще не защищают от новых "дрейфующих" вирусов. В результате требуется каждый год получать новую вакцину против вирусов H1 и H3, которые по прогнозам могут появиться, этот процесс является очень дорогостоящим, а также не всегда эффективным. Аналогичное положение относится к производству вакцины против вируса гриппа H5.

НА является основным поверхностным белком вируса гриппа А, который представляет собой основную мишень нейтрализующих антител, которые индуцируются инфекцией или вакцинацией. НА ответствен за связывание вируса с клетками с сиаловой кислотой на мембранах, такими как клетки в верхних дыхательных путях или эритроциты. Кроме того, НА опосредует слияние вирусной оболочки с мембраной эндосомы после снижения pH. НА представляет собой гомотримерный интегральный мембранный гликопротеин. Тример НА состоит из трех идентичных мономеров, каждый из которых образован из единичной полипептидной цепи интактного HA0 с областями HA1 и HA2, соединенными с помощью двух дисульфидных мостиков. Каждая HA2-область принимает альфа-спиральную структуру "coiled coil" и преимущественно образует область "ствола" или "стебля" НА, в то время как HA1-область представляет собой небольшой глобулярный домен, содержащий смесь  $\alpha/\beta$ -структур ("головная" область НА). Глобулярная головная область НА опосредует связывание с сиаловой кислотой-рецептором, в то время как ствол НА опосредует последующие слияние между вирусами и клеточными мембранами, что запускается в эндосомах при снижении значения pH. В то время как иммунодоминантный глобулярный головной домен НА обладает высокой пластичностью, при которой различные антигенные сайты постоянно подвергаются антигенному дрейфу, стволовая область НА является относительно консервативной среди подтипов. Современные вакцины против гриппа главным образом индуцируют иммунный ответ против иммунодоминантной и варибельной головной области НА, которая эволюционирует быстрее, чем стволовая область НА (Kirkpatrick E., Qiu X., Wilson P.C., Bahl J., Krammer F., The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Sci Rep.* 8(1), 11 июля 2018 г., с. 10432). Таким образом, конкретная вакцина против гриппа, как правило, обеспечивает защиту в течение не более чем нескольких лет и требуется ежегодная реконструкция вакцин против гриппа.

Для решения указанных проблем в последние годы разработан новый класс нейтрализующих вирус гриппа антител, мишенью которых являются консервативные сайты в стволе НА, в качестве терапии против вируса гриппа. Эти антитела, таргетирующие стволовую область НА, как правило, обладают более широким спектром нейтрализации по сравнению с антителами, таргетирующими головную область НА. Обзор обладающих широким спектром действия нейтрализующих антител против вируса гриппа А представлен у Corti D. и Lanzavecchia A., Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 2013, с. 705-742. У Okuno с соавторами описана иммунизация мышей вирусом гриппа А/Okuda/57 (H2N2) и выделение моноклонального антитела (С 179), которое связывается с консервативным конформационным эпитопом в HA2 и нейтрализует подтипы H2, H1 и H5 группы 1 вирусов гриппа А, *in vitro* и на животных моделях *in vivo* (Okuno и др., 1993; Smirnov и др., 1999; Smirnov и др., 2000). Другие примеры антител, таргетирующих стволовую область НА, включают CR6261 (Throsby M., van den Brink E.,

Jongeneelen M., Poon L.L.M., Alard P., Cornelissen L. и др. Heterosubtypic Neutralizing Monoclonal Antibodies Cross-Protective against H5N1 and H1N1 Recovered from Human IgM<sup>+</sup> Memory B Cells. *PLoS ONE* 3(12), 2008: e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>; Friesen R.H.E., Koudstaal W., Koldijk M.H., Weverling G.J., Brakenhoff J.P.J., Lenting P.J. и др. New Class of Monoclonal Antibodies against Severe Influenza: Prophylactic and Therapeutic Efficacy in Ferrets. *PLoS ONE* 5(2), 2010: e9106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009106>), F10 (Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., Wan H., Murakami A., Yammanuru A., Han T., Cox N.J., Bankston L.A., Donis R.O., Liddington R.C., Marasco W.A. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nature Structural & Molecular Biology*. 16 (3), март 2009 г., с. 265-273. doi:10.1038/nsmb.1566), CR8020 (Ekiert D.C., Friesen R.H.E., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M. и др. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333(6044), 2011, с. 843-850), F16 (Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A. и др. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333(6044), 2011, с. 850-856) и CR9114 (Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R. и др. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 337(6100), 2012, с. 1343-1348).

Однако антитела, обладающие способностью давать реакцию со стволочной областью НА подтипов из обеих групп 1 и 2, являются очень редкими и, как правило, для них не установлена способность полностью охватывать все подтипы. В последние годы описано антитело MEDI8852, которое эффективно нейтрализует вирусы гриппа А групп 1 и 2 с беспрецедентной широтой, обладает способностью нейтрализовать разнообразную панель репрезентативных вирусов, возникших в течение >80 лет эволюции антигенов (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. и др. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell* 166(3), 2016, с. 596-608; Paules C.I. и др. The Hemagglutinin A Stem Antibody MEDI8852 Prevents and Controls Disease and Limits Transmission of Pandemic Influenza Viruses. *J Infect Dis* 216, 2017, с. 356-365, <https://doi.org/10.1093/infdis/jix292>). Установлено, что MEDI8852 связывается с высоко консервативным эпитопом, что существенно отличает его от нейтрализующих антител, реактивных в отношении других структурно охарактеризованных стволов (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. и др. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell*, 166(3), 2016, с. 596-608).

В свете вышесказанного, задачей, положенной в основу настоящего изобретения, было получение нового антитела, которое максимально широко и эффективно нейтрализует вирус гриппа А, даже при введении в очень низких дозах.

Указанная задача решается с помощью объектов изобретения, представленных ниже и в прилагаемой формуле изобретения.

Хотя настоящее изобретение подробно описано ниже, должно быть очевидно, что указанное изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами и реагентами, указанными в настоящем описании, которые могут варьироваться. Кроме того, должно быть очевидно, что применяемая в настоящем описании терминология не направлена на ограничение объема настоящего изобретения, который может быть ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в настоящем описании, имеют общепринятые значения, известные обычно специалисту в данной области.

Ниже описаны элементы настоящего изобретения. Указанные элементы перечислены с использованием конкретных вариантов осуществления изобретения однако, как должно быть очевидно, их можно объединять любым образом и в любом количестве, создавая дополнительные варианты осуществления изобретения. Не следует считать, что различные описанные примеры и варианты осуществления изобретения ограничивают настоящее изобретение только конкретно описанными вариантами его осуществления. Следует понимать, что настоящее описание подтверждает и охватывает варианты осуществления изобретения, которые объединяют специально описанные варианты осуществления изобретения с любым количеством заявленных элементов. Кроме того, любые варианты и комбинации всех описанных в настоящей заявке элементов следует рассматривать как включенные в настоящую заявку, если из контекста не следует иное.

В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, если из контекста не требуется иное, подразумевается, что понятие "содержат" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", включает указанный элемент, целое число или стадию, но не исключает любые другие не указанные элемент, целое число или стадию. Понятие "состоят из" является конкретным вариантом понятия "содержат", из которого исключены любые другие не указанные элемент, целое число или стадия. В контексте настоящего изобретения понятие "содержат" включает понятие "состоят из". Таким образом, под понятие "содержащий" подпадают понятия "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать дополнительный компонент, например, X + Y.

Употребление понятия в единственном числе и аналогичные ссылки в контексте описания изобретения (прежде всего в контексте формулы изобретения) относятся к его употреблению и в единственном, и во множественном числе, если в настоящем описании не указано иное или если это явно противоречит

контексту. Перечисление диапазонов величин в настоящем описании исключительно служит для укорочения метода ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, подпадающую под указанный диапазон. Если в настоящем описании не указано иное, то каждая индивидуальная величина включена в описание таким образом, как если бы она была индивидуально указана в настоящем описании. Никакой употребляемый в настоящем описании язык не следует рассматривать в качестве указания на какой-либо незаявленный и важный для воплощения изобретения на практике элемент.

Понятие "практически" не исключает "полностью", например, композиция, которая "практически свободна от" Y, может быть полностью свободна от Y. При необходимости слово "практически" может быть опущено в определении, представленном в изобретении.

Понятие "примерно" касательно численного значения  $x$  означает  $x \pm 10\%$ , например,  $x \pm 5\%$ , или  $x \pm 7\%$ , или  $x \pm 10\%$ , или  $x \pm 12\%$ , или  $x \pm 15\%$ , или  $x \pm 20\%$ .

Подразумевается, что применяемое в настоящем описании понятие "заболевание" имеет общепринятые синонимы и его можно использовать взаимозаменяемо с понятиями "нарушение" и "состояние" (в качестве медицинского состояния), поскольку все они обозначают аномальное состояние организма животного или человека или одной из его частей, ухудшающее нормальное функционирование, что, как правило, проявляется в виде различных признаков и симптомов и приводит к пониженной продолжительности жизни или ухудшению качества жизни человека или животного.

В контексте настоящего описания подразумевается, что "лечение" индивидуума или пациента включает предупреждение, профилактику, ослабление, облегчение симптомов и терапию. Понятия "индивидуум" или "пациент" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения всех млекопитающих, включая человека. Примеры индивидуумов включают человека, крупный рогатый скот, собак, кошек, лошадей, овец, свиней и кроликов. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент представляет собой человека.

Дозы часто выражают относительно веса тела. Так, доза, выраженная в виде [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т.д.), как правило, относится к [г, мг или другая единица] "на кг (или г, мг и т.д.) веса тела", даже, если понятие "вес тела" специально не упоминается.

Понятие "специфическое связывание" и аналогичные понятия не включают неспецифическое прилипание.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" охватывает различные формы антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) полные антитела, фрагменты антител, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и генетически сконструированные антитела (варианты антител или мутантные антитела), если они сохраняют характерные свойства, предлагаемые в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. Например, антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело.

Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, с. 368-374). Человеческие антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые могут после иммунизации продуцировать полный спектр или отобранные человеческие антитела в отсутствие эндогенного производства иммуноглобулинов. Перенос массива генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в указанную зародышевую мутантную мышиную линию может приводить к производству человеческих антител после контрольного заражения антигеном (см., например, Jakobovits A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, с. 2551-2555; Jakobovits A. и др., *Nature*, 362, 1993, с. 255-258; Bruggemann M. и др., *Year Immunol.* 7, 1993, с. 3340). Человеческие антитела можно получать также в фаговых дисплейных библиотеках (Hoogenboom H. R. и Winter G., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, с. 381-388; Marks J. D. и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, с. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно применять также методики, описанные у Cole с соавторами и Voerner с соавторами (Cole и др., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, изд-во Alan R. Liss, 1985, с. 77 и Voerner P. и др., *J. Immunol.* 147, 1991, с. 86-95). В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела можно получать с помощью усовершенствованной иммортализации клеток EBV-B согласно методу, описанному у Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Koleznikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A., An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med.* 10(8), 2004, с. 871-875. В контексте настоящего описания понятие "вариабельная область" (вариабельная область легкой цепи ( $V_L$ ) и вариабельная область тяжелой цепи ( $V_H$ )) означает каждую из пары легких и тяжелых цепей, которая непосредственно участвует в связывании антитела с антигеном.

Антитела, предлагаемые в изобретении, могут относиться к любому изотипу (например, IgA, IgG, IgM т.е. тяжелая  $\alpha$ -,  $\gamma$ - или  $\mu$ -цепь). Например, антитело относится к IgG-типу. Антитела IgG-изотипа могут относиться к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, IgG1. Антитела, предлагаемые в изобретении, могут иметь легкую  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к IgG1-типу и имеет легкую  $\kappa$ -цепь.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать в очищенной форме. Как правило, антитело может присутствовать в композиции, которая практически свободна от других полипептидов, например, на долю других полипептидов приходится менее чем 90 мас.%, как правило, менее чем 60% и более предпочтительно менее 50% композиции.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут обладать иммуногенностью в организме человека-хозяина и/или животных-хозяев кроме человека (или гетерологичных хозяев), например, в организме мышей. Например, антитела могут иметь идиотип, иммуногенный в организме животных-хозяев кроме человека, но не в организме человека-хозяина. Антитела, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения на людях, включают антитела, которые нельзя легко выделять из таких хозяев, как мыши, козы, кролики, крысы, приматы кроме человека и т.д., и которые, как правило, нельзя получить путем гуманизации или из мышей после ксенотрансплантации (модель хепо-misce).

В контексте настоящего описания "нейтрализующее антитело" представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, т.е. предупреждать, ингибировать, снижать, затруднять или воздействовать на способность патогена иницировать и/или поддерживать инфекцию у хозяина. Понятия "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" применяют в настоящем описании взаимозаменяемо. Указанные антитела можно применять индивидуально или в комбинации в виде профилактических или терапевтических агентов после приготовления соответствующей препаративной формы, в сочетании с активной вакцинацией, в качестве диагностического инструмента или в качестве инструмента для производства согласно указанному в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "мутация" относится к изменению в нуклеотидной последовательности и/или в аминокислотной последовательности по сравнению с референс-последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с геномной последовательностью, может представлять собой, например (встречающуюся в естественных условиях) соматическую мутацию, спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, мутацию, индуцированную ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацию, полученную с помощью сайтнаправленного мутагенеза (методы молекулярной биологии для получения специфических и преднамеренных изменений в нуклеотидной последовательности и/или в аминокислотной последовательности). Таким образом, следует понимать, что понятия "мутация" или "мутировать" включают также созданную физическим путем мутацию, например, в нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и инсерцию одного или нескольких нуклеотидов или одной или нескольких аминокислот, а также инверсию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для создания мутации в аминокислотной последовательности мутацию можно интродуцировать в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутантного полипептида. Мутацию можно создавать, например, путем изменения, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, с получением кодона, кодирующего другую аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности, например, на основе знания о нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, и путем разработки синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует вариант полипептида, без необходимости в осуществлении мутации одного или нескольких нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

В описании настоящей заявки процитировано несколько документов. Каждый из документов, процитированных выше или ниже в настоящем описании (включая все патенты, заявки на патент, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. Ничто из изложенного в настоящем описании не следует истолковывать как допущение того, что изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию сущности в силу предшествующего изобретения.

Должно быть очевидно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами и реагентами, указанными в настоящем описании, которые могут варьировать. Кроме того, должно быть очевидно, что применяемая в настоящем описании терминология не направлена на ограничение объема настоящего изобретения, который может быть ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в настоящем описании, имеют общепринятые значения, известные обычному специалисту в данной области.

Антитела.

Изобретение базируется, помимо других полученных данных, на идентификации антител, которые эффективно снижают инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А, даже при введении в очень низких дозах. Кроме того, у антител, предлагаемых в изобретении, обнаружено удлиненное время полужизни. Не вдаваясь в какую-либо теорию, при создании настоящего изобретения высказано предположение о том, что повышенная эффективность антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, не зависит от удлиненного времени полужизни. Например, относительно применения для сравнения антитела антитело, предлагаемое в изобретении, обладает повышенной эффективностью, несмотря на сходные концентрации антитела в плазме. Кроме того, неожиданно было установлено, что антитела, предлагаемые в на-

стоящем изобретении, обладают пониженной иммуногенностью по сравнению с родительскими антителами без мутаций M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.

Первым объектом настоящего изобретения является (выделенное) антитело, которое содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; и мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.

В целом, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, как правило, содержит (по меньшей мере) три определяющих комплементарность области (CDR) на тяжелой цепи и (по меньшей мере) три CDR на легкой цепи. В целом, определяющие комплементарность области (CDR) представляют собой гипервариабельные участки, присутствующие в вариабельных доменах тяжелых цепей и вариабельных доменах легких цепей. Как правило, CDR тяжелой цепи и связанной с ней легкой цепи антитела вместе образуют антигенный рецептор. Как правило, три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) не последовательно расположены в вариабельном домене. Поскольку антигенные рецепторы, как правило, состоят из двух вариабельных доменов (на двух различных полипептидных цепях, т.е. на тяжелой и легкой цепях), то в каждом антигене рецепторе присутствуют шесть CDR (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2 и CDRH3; легкая цепь: CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Классическая индивидуальная молекула антитела имеет два антигенных рецептора и, следовательно, содержит двенадцать CDR. CDR на тяжелой и/или легкой цепи могут разделяться каркасными участками, где каркасный участок (FR) представляет собой область в вариабельном домене, менее "вариабельную" по сравнению с CDR. Например, цепь (или каждая цепь соответственно) может состоять из четырех каркасных участков, разделенных тремя CDR.

Были определены последовательности тяжелых и легких цепей приведенных в качестве примера антител, предлагаемых в изобретении, которые содержали три различных CDR на тяжелой цепи и три различных CDR на легкой цепи. Положение аминокислот CDR определяли согласно системе нумерации IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc, M.-P. и др. *Nucleic Acids Res.* 37, 2009, D1006-D1012).

Как правило, антитело, предлагаемое в изобретении, связывается с гемагглютинином вируса гриппа А. Таким образом, антитело, предлагаемое в изобретении, может нейтрализовать инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А. Благодаря шести указанным выше последовательностям CDR, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с тем же эпитопом стволовой области гемагглютинаина вируса гриппа А (IAV HA), что и антитело MEDI8852 (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. и др. *Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes*. *Cell*, 166(3), 2016, с. 596-608), обеспечивая тем самым столь же широкую защиту против различных серотипов вируса гриппа А всех подтипов вируса гриппа А.

Кроме того, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, включает две мутации в константной области тяжелой цепи (в CH3-участке): M428L и N434S. В этом контексте аминокислотные положения нумерованы согласно принятой в данной области системе EU-нумерации. Понятия "EU-индекс" или "EU-индекс согласно Кэботу", или "EU-нумерация" относятся к EU-нумерации антител (Edelman G.M., Cunningsham B.A., Gall W.E., Gottlieb P.D., Rutishauser U., Waxdal M. J. *The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63(1), 1969, с. 78-85; Kabat E.A., National Institutes of Health (U.S.) Office of the Director, *Sequences Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А, в дозе, которая не превышает половину дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной третьей дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной четвертой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной пятой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной шестой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной седьмой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной восьмой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной

девятой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза антитела, предлагаемого в изобретении, не превышает одной десятой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела. Должно быть очевидно, что для указанных сравнительных тестов применяют сопоставимые анализы нейтрализации (сходные анализы тестов, условия тестов и т.д.). Например, один и то же тест (отличающийся только подлежащими тестированию антителами) можно применять для определения дозы антитела, предлагаемого в изобретении, которая требуется для нейтрализации вируса гриппа А, и для определения дозы применяемого для сравнения антитела, которая требуется для нейтрализации вируса гриппа А.

Для изучения и количественной оценки инфекционности вируса (или "нейтрализации") в лабораторных условиях специалисту в данной области известны различные стандартные "анализы нейтрализации". Для осуществления анализа нейтрализации, как правило, вирусы животных размножают в клетках и/или линиях клеток. Например, при осуществлении анализа нейтрализации культивируемые клетки можно инкубировать с фиксированным количеством вируса гриппа А (IAV) в присутствии подлежащего тестированию антитела (или без него). Для считывания данных можно применять, например, проточную цитометрию. Альтернативно этому, можно применять также другие методы считывания данных.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело нейтрализует вирусы, которые кодируют полиморфизмы HA1 P11S, HA2 D46N и/или HA2 N49T гемагглютинина (штамма) H3N2 (H3 HA); и/или полиморфизм N146D гемагглютинина (штамма) H1N1 (H1 HA). Например, антитело может нейтрализовать один или два полиморфизма HA1 P11S, HA2 D46N или HA2 N49T штамма H3 HA. В частности, антитело может нейтрализовать все три полиморфизма HA1 P11S, HA2 D46N и HA2 N49T штамма H3 HA. Кроме того, антитело может нейтрализовать полиморфизм N146D штамма H1 HA. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело нейтрализует полиморфизмы HA1 P11S, HA2 D46N и HA2 N49T штамма H3 HA; и полиморфизм N146D штамма H1 HA. Касательно указанных полиморфизмов эталоном для H1N1 является A/California/07/2009, а эталоном для H3N2 является A/Perth/16/2009.

В некоторых случаях антитело нейтрализует полиморфизмы HA1 P11S, HA2 D46N и/или HA2 N49T штамма H3 HA; и/или полиморфизм N146D штамма H1 HA, при этом кратность изменений IC<sub>50</sub> составляет < 2 по сравнению с HA вируса дикого типа, в частности, при осуществлении параллельного сравнения с вирусом дикого типа. Например, антитело может нейтрализовать один или два полиморфизма HA1 P11S, HA2 D46N или HA2 N49T штамма H3 HA, при этом кратность изменений IC<sub>50</sub> составляет < 2 по сравнению с HA вируса дикого типа, в частности, при осуществлении параллельного сравнения с вирусом дикого типа. В частности, антитело может нейтрализовать все три полиморфизма HA1 P11S, HA2 D46N и HA2 N49T штамма H3 HA, при этом кратность изменений IC<sub>50</sub> составляет < 2 по сравнению с HA вируса дикого типа, в частности, при осуществлении параллельного сравнения с вирусом дикого типа. Кроме того, антитело может нейтрализовать полиморфизм N146D штамма H1 HA, при этом кратность изменений IC<sub>50</sub> составляет < 2 по сравнению с HA вируса дикого типа, в частности, при осуществлении параллельного сравнения с вирусом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело нейтрализует полиморфизмы HA1 P11S, HA2 D46N и HA2 N49T штамма H3 HA; и полиморфизм N146D штамма H1 HA, при этом в каждом случае кратность изменений IC<sub>50</sub> составляет < 2 по сравнению с HA вируса дикого типа, в частности, при осуществлении параллельного сравнения с вирусом дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело вызывает пониженный ответ в виде антител к лекарственному препарату (ADA) относительно применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи. В частности, антитело может обладать меньшей иммуногенностью относительно применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи. Как продемонстрировано в примерах, представленных в настоящем описании, при создании антитела неожиданного было установлено, что антитело, предлагаемое в изобретении, вызывает пониженный ответ в виде антител к лекарственному препарату (ADA) и в результате обладает меньшей иммуногенностью по сравнению с антителом без мутаций M428L/N434S. Специалисту в данной области известны тесты, пригодные для оценки ответов в виде антител к лекарственному препарату (ADA) /иммуногенности. Любой из указанных тестов можно выбирать так, чтобы антитело, предлагаемое в изобретении, и применяемое для сравнения антитело без мутаций M428L/N434S тестировать параллельно для осуществления непосредственного сравнения. Примеры тестов представлены в примерах 9 и 10 в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой моноклональное антитело. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой человеческое моноклональное антитело.

Антитела, предлагаемые в изобретении, могут относиться к любому изотипу (например, IgA, IgG, IgM, т.е. иметь тяжелую  $\alpha$ - ,  $\gamma$ - или  $\mu$ -цепь). Например, антитело может относиться к IgG-типу. В пределах IgG-изотипа антитела могут относиться к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, IgG1. Ан-

титела, предлагаемые в изобретении, могут иметь легкую  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет легкую каппа-цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к IgG1-типу и имеет легкую каппа-цепь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к человеческому IgG1-типу. Антитело может иметь любой аллотип. Понятие "аллотип" относится к аллельной вариации, характерной для IgG-подклассов. Например, антитело может относиться к аллотипу G1m1 (или G1m(a)), аллотипу G1m2 (или G1m(x)), аллотипу G1m3 (или G1m(f)), и/или аллотипу G1m17 (или Gm(z)). Аллотипы G1m3 и G1m17 локализованы в одном положении в CH1-домене (положение 214 согласно EUnумерации). G1m3 соответствует R214 (EU), а G1m17 соответствует K214 (EU). Аллотип G1m1 локализован в CH3-домене (в положениях 356 и 358 (EU)) и соответствует заменам E356D и M358L. Аллотип G1m2 относится к замене аланина в положении 431 (EU) на глицин. Аллотип G1m1 может быть объединен, например, с аллотипом G1m3 или G1m17. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к аллотипу G1m3 без G1m1 (G1m3,-1). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет аллотип G1m17,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет аллотип G1m3,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к аллотипу G1m17 без G1m1 (G1m17,-1). Необязательно указанные аллотипы могут быть объединены (или не объединены) с аллотипом G1m2, G1m27 или G1m28. Например, антитело может иметь аллотип G1m17,1,2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности (последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые представлены в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно).

Идентичность последовательностей, как правило, рассчитывают относительно всей длины референс-последовательности (т.е. последовательности, указанной в заявке). В контексте настоящего описания процент идентичности можно определять, например, с помощью BLAST, используя задаваемые по умолчанию параметры, предложенные NCBI (Национальный центр биотехнологической информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [матрица Blosum 62; штраф за открытие бреши = 11 и штраф за удлинение бреши = 1].

"Вариант последовательности" имеет измененную последовательность, в которой одна аминокислота или несколько аминокислот в референс-последовательности удалена(ы) или заменена(ы), и/или одна аминокислота или несколько аминокислот встроена(ы) в последовательность аминокислотной референс-последовательности. В результате изменений вариант аминокислотной последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична референс-последовательности. Вариант последовательности, идентичный по меньшей мере на 70%, имеет не более 30 изменений, т.е. любую комбинацию делеций, инсерций или замен на 100 аминокислот референс-последовательности.

В целом, хотя могут иметь место неконсервативные аминокислотные замены, замены, как правило, представляют собой консервативные аминокислотные замены, при которых применяемая для замены аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в референс-последовательности. Например, консервативные аминокислотные замены включают замену одной из алифатических или гидрофобных аминокислот, например, аланина, и валина, лейцина и изолейцина, на другую; замену одной из содержащих гидроксил аминокислот, например, серина и треонина, на другую; замену одного из кислых остатков, например, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, на другой; замену одного содержащего амид остатка, например, аспарагина и глутамина, на другой; замену одного ароматического остатка, например, фенилаланина и тирозина, на другой; замену одного основного остатка, например, лизина, аргинина и гистидина, на другой; и замену одной из низкомолекулярных аминокислот, например, аланина, серина, треонина, метионина и глицина, на другую.

Инсерции в аминокислотную последовательность включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния, имеющие длину от одного остатка до полипептидов, которые содержат сто или более остатков, а также инсерции внутрь последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают слияние N- или C-конца аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 75% или более (т.е. на 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и вариабельную

область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 80% или более (т.е. на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 85% или более (т.е. на 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 90% или более (т.е. на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную на 95% или более (т.е. на 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит, представленную в SEQ ID NO: 8, в которых сохраняются указанные выше CDR-последовательности.

В целом, антитело, предлагаемое в изобретении, может содержать одну или несколько дополнительных мутаций (помимо M428L и N434S) в Fc-области (например, в CH2- или CH3-участке). Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, не содержит какой-либо дополнительной мутации помимо M428L и N434S в его CH3-участке (в сравнении с соответствующим CH3-участком дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, не содержит какой-либо дополнительной мутации помимо M428L и N434S в его Fc-области (в сравнении с соответствующей Fc-областью дикого типа). В контексте настоящего описания понятие "дикий тип" относится к референс-последовательности, например, встречающейся в естественных условиях. В качестве конкретного примера понятие "дикий тип" может относиться к последовательности, наиболее часто встречающейся в естественных условиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, может иметь тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленную в SEQ ID NO: 10.

Антитела, предлагаемые в изобретении, включают также гибридные молекулы антител, которые содержат шесть CDR из антитела, предлагаемого в изобретении, которое описано выше, и один или несколько CDR из другого антитела к такому же или другому эпитопу или антигену. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные гибридные антитела содержат шесть CDR из антитела, предлагаемого в изобретении, и шесть CDR из другого антитела к другому эпитопу или антигену.

Под объем изобретения подпадают также варианты антител. Таким образом, под объем изобретения подпадают также и варианты последовательностей, указанных в настоящей заявке. Указанные варианты включают встречающиеся в естественных условиях варианты, образовавшиеся в результате соматической мутации *in vivo* в процессе иммунного ответа или *in vitro* при культивировании иммортализованных клонов В-клеток. Альтернативно этому, варианты могут возникать в результате вырожденности генетического кода или вследствие ошибок при транскрипции или трансляции.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать в очищенной форме. Как правило, антитело должно присутствовать в композиции, практически свободной от других полипептидов, например, в которой менее 90% (мас.%), как правило, менее 60% и более предпочтительно менее 50% композиции приходится на долю других полипептидов.

Антитела, предлагаемые в изобретении, могут быть иммуногенными для хозяев кроме человека (или гетерологичных хозяев), например, мышей. В частности, антитела могут иметь идиотип, иммуногенный для хозяев кроме человека, но не для человека-хозяина. В частности, антитела, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения на человеке, включают антитела, которые нельзя легко

выделять из таких хозяев, как мыши, козы, кролики, млекопитающие кроме приматов и т.д. и которые, как правило, нельзя получить путем гуманизации или из мышей после ксенотрансплантации (модель хепо-mice).

Нуклеиновые кислоты.

Другим объектом изобретения является также молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, который кодирует указанное выше антитело, предлагаемое в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит

(I) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 12, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности; и

(II) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 13, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит

(I) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 14, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности, и мутации M428L и N434S в константной области; и

(II) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 15, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности, и мутации M428L и N434S в константной области.

Примеры молекул нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидов включают, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулу РНК, такую как молекула рРНК, мРНК, mi-РНК, si-РНК или tРНК, или молекулу ДНК, такую как κДНК. Нуклеиновые кислоты могут кодировать легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела, предлагаемого в изобретении. Иными словами, легкая цепь и тяжелая цепь антитела могут кодироваться одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты (например, бицистронно). Альтернативно этому, легкая цепь и тяжелая цепь антитела могут кодироваться различными молекулами нуклеиновых кислот.

С учетом избыточности генетического кода настоящее изобретение включает также варианты последовательностей нуклеотидных последовательностей, которые кодируют одни и те же аминокислотные последовательности. Полинуклеотид, кодирующий антитело (или полную молекулу нуклеиновой кислоты), можно оптимизировать для экспрессии антитела. Например, оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности можно применять для повышения эффективности трансляции в экспрессионных системах, предназначенных для получения антитела. Приведенные в качестве примера нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13, 14 и 15 представляют собой последовательности с оптимизированными кодонами, предназначенные для экспрессии приведенного в качестве примера антитела Flu-AB\_MLNS. Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичные элементы (т.е. элементы, которые в естественных условиях не встречаются в той же самой молекуле нуклеиновой кислоты, что и кодирующая последовательность (тяжелой или легкой цепи) антитела. Например, молекула нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичный промотор, гетерологичный энхансер, гетерологичную UTR (например, для оптимальной трансляции/экспрессии), гетерологичный поли-А-хвост и т.п.

Молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, содержащую компоненты нуклеиновой кислоты. Понятие "молекула нуклеиновой кислоты", как правило, относится к молекулам ДНК или РНК. Его можно применять в виде синонима понятию "полинуклеотид", т.е. молекула нуклеиновой кислоты может состоять из полинуклеотида, кодирующего антитело. Альтернативно этому, молекула нуклеиновой кислоты может содержать также дополнительные элементы помимо полинуклеотида, кодирующего антитело. Как правило, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полимер, содержащий или состоящий из нуклеотидных мономеров, которые ковалентно связаны друг с другом посредством фосфодиэфирных связей сахарно/фосфатного каркаса. Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" включает также модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекулы ДНК или РНК с модифицированными основаниями, модифицированными сахарами или модифицированным каркасом и т.д.

В целом, молекулу нуклеиновой кислоты можно подвергать манипуляциям, встраивая, изымая пу-

тем делеции или изменяя некоторые нуклеотидные последовательности. Изменения в результате указанной манипуляции включают (но, не ограничиваясь только ими) изменения для интродукции сайтов рестрикции, для коррекции предпочтения кодонов, для добавления или оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных последовательностей и т.д. Можно также изменять нуклеиновую кислоту для изменения кодируемых аминокислот. Например, может оказаться ценным интродуцировать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в аминокислотную последовательность антитела. Указанные точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, аффинность связывания антигена, пост-трансляционные модификации, иммуногенность и т.д., можно интродуцировать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или можно интродуцировать метки (например, для целей очистки). Альтернативно этому, мутация нуклеотидной последовательности может быть "молчащей", т.е. не проявляться в аминокислотной последовательности из-за избыточности генетического кода. В целом, мутации можно интродуцировать в конкретные сайты или можно интродуцировать случайным образом с последующей селекцией (например, молекулярная эволюция). Например, одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих любые легкие или тяжелые цепи (приведенного в качестве примера) антитела, можно подвергать случайной или направленной мутации для придания различных свойств кодируемым аминокислотам. Указанные изменения могут приводить к итерационному процессу, при котором начальные изменения могут сохраняться, а интродуцироваться новые изменения в других нуклеотидных положениях. Кроме того, можно объединять изменения, полученные на независимых стадиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (или (полная) молекула нуклеиновой кислоты), может иметь оптимизированные кодоны. Специалисту в данной области известны различные инструменты для оптимизации кодонов, например, описанные у Ju Xin Chin, Bevan Kai-Sheng Chung, Dong-Yup Lee, Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design, *Bioinformatics*, т. 30, выпуск 15, 1 августа 2014 г., с. 2210-2212; или у Grote A., Hiller K., Scheer M., Munch R., Nortemann B., Hempel D.C., Jahn D., JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.* 1 июля 2005 г. 33 (издание Web Server):W526-31; или, например, представленные в алгоритме OptimumGene™ фирмы Genscript (описан в US 2011/0081708 A1).

В настоящем изобретении предложена также комбинация первой и второй молекул нуклеиновых кислот, в которой первая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, предлагаемого в настоящем изобретении; а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий соответствующую легкую цепь того же антитела. Указанное выше описание, касающееся (основных) особенностей молекулы нуклеиновой кислоты, предлагаемой в изобретении, применимо соответственно к первой и второй молекулам нуклеиновых кислот, входящих в комбинацию. Таким образом, один или оба полинуклеотида, который/которые кодирует(ют) тяжелую(ые) и/или легкую(ие) цепь(и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представляет(ют) собой полинуклеотид(ы) с оптимизированными кодонами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения комбинация молекул нуклеиновых кислот содержит

(I) первую молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 12, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности; и

(II) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 13, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения комбинация молекул нуклеиновых кислот содержит:

(I) первую молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 14, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности и мутации M428L и N434S в константной области; и

(II) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более (т.е. на 71%, 72%,

73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) SEQ ID NO: 15, нуклеотидную последовательность, кодирующую указанные выше CDR-последовательности и мутации M428L и N434S в константной области.

Вектор.

Под объем изобретения подпадают также векторы, например, экспрессионные векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, предлагаемую в настоящем изобретении, или комбинацию молекул нуклеиновых кислот, предлагаемую в настоящем изобретении (например, в бидистронном формате). Как правило, вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше, или комбинацию молекул нуклеиновых кислот, описанную выше (например, в бидистронном формате).

В настоящем изобретении предложена также комбинация первого и второго векторов, в которой первый вектор содержит первую молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше (для комбинации молекул нуклеиновых кислот), а второй вектор содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше (для комбинации молекул нуклеиновых кислот).

Вектор, как правило, представляет собой рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, т.е. молекулу нуклеиновой кислоты, которая не встречается в естественных условиях. Таким образом, вектор может содержать гетерологичные элементы (т.е. элементы последовательности, отличающиеся от встречающихся в природе). Например, вектор может содержать сайт множественного клонирования, гетерологичный промотор, гетерологичный энхансер, гетерологичный маркер селекции (для идентификации клеток, содержащих указанный вектор, по сравнению с клетками, которые не содержат указанный вектор) и т.п. Вектор в контексте настоящего изобретения можно применять для включения или укрытия требуемой нуклеотидной последовательности. Указанные векторы могут представлять собой векторы для хранения, экспрессионные векторы, клонирующие векторы, векторы для переноса и т.д. Вектор для хранения представляет собой вектор, который обеспечивает удобное хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Так, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например (тяжелой и/или легкой цепи) требуемому антителу, предлагаемому в настоящем изобретении. Экспрессионный вектор можно применять для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например, мРНК, или пептидов, полипептидов или белков. Например, экспрессионный вектор может содержать последовательности, необходимые для транскрипции сегмента последовательности вектора, такого как (гетерологичная) промоторная последовательность. Клонированный вектор, как правило, представляет собой вектор, который содержит сайт клонирования, который можно применять для включения нуклеотидных последовательностей в вектор. Клонированный вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или вектор на основе бактериофага. Вектор для переноса может представлять собой вектор, который можно применять для переноса молекул нуклеиновых кислот в клетки или организмы, например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может представлять собой, например, РНК-вектор или ДНК-вектор. Например, вектор в контексте настоящего изобретения содержит сайт клонирования, маркер для селекции, такой как фактор устойчивости, к антибиотикам, и последовательность, которую можно применять для размножения вектора, такую как сайт инициации репликации. Вектор в контексте настоящего описания может представлять собой плазмидный вектор.

Клетки.

Следующим объектом настоящего изобретения является также клетка, экспрессирующая антитело, предлагаемое в настоящем изобретении; и/или содержащая вектор, предлагаемый в настоящем изобретении.

Примеры таких клеток включают (но, не ограничиваясь только ими) эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, клетки животных или клетки растений, или прокариотические клетки, например, *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки представляют собой клетки млекопитающих, например, линию клеток млекопитающих. Примеры включают человеческие клетки, СНО-клетки, НЕК293Т-клетки, PER.C6-клетки, NS0-клетки, клетки печени человека, клетки миеломы или клетки гибридомы.

Клетку можно трансфектировать вектором, предлагаемым в настоящем изобретении, например, экспрессионным вектором. Понятие "трансфекция" относится к интродукции молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, например, в эукариотические или прокариотические клетки. В контексте настоящего изобретения понятие "трансфекция" включает любой известный специалисту в данной области метод интродукции молекул нуклеиновых кислот в клетки, такие как клетки млекопитающих. Такие методы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов или трансфекцию на основе катионных полимеров, таких как ДЭАЭ-декстран или полиэтиленмин, и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения интродукция является невирусной.

Кроме того, клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, можно трансфектировать стабильно или одновременно вектором, предлагаемым в настоящем изобретении, например, для экспрессии антитела, предлагаемого в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения клет-

ки стабильно трансфектируют вектором, предлагаемым в настоящем изобретении, который кодирует антитело, предлагаемое в настоящем изобретении. В других вариантах осуществления изобретения клетки временно трансфектируют вектором, предлагаемым в настоящем изобретении, который кодирует антитело, предлагаемое в настоящем изобретении.

Таким образом, в настоящем изобретении предложена также рекомбинантная клетка-хозяин, которая гетерологично экспрессирует антитело, предлагаемое в изобретении, или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, клетка может представлять собой клетку другого вида по сравнению с видом, являющимся источником антитела (например, СНО-клетки, экспрессирующие человеческие антитела). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка относится к типу клеток, которые не экспрессируют (такие) антитела в естественных условиях. Кроме того, клетка-хозяин может передавать антителу пост-трансляционную модификацию (РТМ; например, гликозилирование), которая отсутствует в его естественном состоянии. Указанная РТМ может приводить к функциональному отличию (например, пониженной иммуногенности). Таким образом, антитело, предлагаемое в изобретении, или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь пост-трансляционную модификацию, которая отличает его от полученного в естественных условиях антитела (например, антитела, образующегося при иммунном ответе у человека).

Получение антител.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать любым методом, известным в данной области. Например, хорошо известна общая методология создания моноклональных антител с использованием технологии гибридом (Kohler G. и Milstein C., 1975; Kozbar и др., 1983). В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют альтернативный метод иммортализации с использованием EBV, описанный в WO 2004/076677'.

В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют метод, описанный в WO 2004/076677, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. При осуществлении этого метода В-клетки, продуцирующие антитело, предлагаемое в изобретении, трансформируют EBV и активатором поликлональных В-клеток. Необязательно в процессе стадии трансформации можно добавлять дополнительные стимуляторы клеточного роста для дополнительного повышения эффективности. Эти стимуляторы могут представлять собой цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В одном из объектов изобретения IL-2 добавляют в процессе стадии иммортализации для дополнительного повышения эффективности иммортализации, но его применение не является необходимым. Полученные с помощью этого метода иммортализованные В-клетки можно затем культивировать с использованием методов, известных в данной области, и выделять из них антитела.

Другой приведенный в качестве примера метод описан в WO 2010/046775. При осуществлении этого метода культивируют плазматические клетки в ограниченном количестве или единичные плазматические клетки в микролуночных культуральных планшетах. Антитела можно выделять из культур плазматических клеток. Кроме того, из культур плазматических клеток можно экстрагировать РНК и осуществлять ПЦР с использованием известных в данной области методов. VH- и VL-области антител можно амплифицировать с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенировать и клонировать в экспрессионном векторе, которым затем трансфектировать НЕК293Т-клетки или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессионных векторах, трансфекцию клеток-хозяев, культивирование трансфектированных клеток-хозяев и выделение полученного антитела можно осуществлять с использованием любых методов, известных специалистам в данной области.

Антитела можно при необходимости дополнительно очищать, используя фильтрацию, центрифугирование и различные хроматографические методы, такие как ЖХВР или аффинная хроматография. Методики очистки антител, например, моноклональных антител, включая методики получения имеющих фармацевтическую чистоту антител, хорошо известны в данной области.

Для получения последовательностей ДНК, которые кодируют антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Требуемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости можно применять методы сайтнаправленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Любую приемлемую систему клетка-хозяин /вектор можно применять для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антител, предлагаемые в настоящем изобретении. Системы экспрессии на основе эукариотических клеток, например, клеток млекопитающих, в качестве клеток-хозяев, можно применять для получения молекул антител, таких как молекулы полных антител. Приемлемые клетки млекопитающих, применяемые в качестве хозяев, включают (но, не ограничиваясь только ими) клетки СНО, НЕК293Т, PER.C6, NS0, миеломы или гибридомы. Кроме того, можно применять системы экспрессии на основе прокариотических, например, бактериальных клеток-хозяев, для получения молекул антител, таких как молекулы полных антител. Приемлемые бактериальные клетки-хозяева включают (но, не ограничиваясь только ими) клетки E. coli.

В настоящем изобретении предложен также способ получения молекулы антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, включающий культивирование (гетерологичной) клетки-хозяина, которая со-

держит вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, в условиях, приемлемых для экспрессии белка с ДНК, которая кодирует молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, и выделение молекулы антитела.

Для получения антитела, которое содержит и тяжелые, и легкие цепи, клеточную линию можно трансфектировать двумя векторами, первым вектором, который кодирует полипептид легкой цепи, и вторым вектором, который кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно этому, можно использовать один вектор, включающий последовательности, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать путем (I) экспрессии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в изобретении, в клетке-хозяине, например, с использованием вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, и (II) выделения продукта экспрессии в виде антитела. Дополнительно метод может включать (III) очистку выделенного антитела. Трансформированные В-клетки и культивируемые плазматические клетки можно подвергать скринингу в отношении их способности продуцировать антитела с требуемой специфичностью или функцией.

Стадию скрининга можно осуществлять с использованием любого иммуноанализа, например, ELISA, путем окрашивания тканей или клеток (включая трансфектированные клетки), путем анализа нейтрализации или любого из многочисленных других методов, известных в данной области, предназначенных для идентификации требуемой специфичности или функции. Анализ можно выбирать только на основе распознавания одного или нескольких антигенов или можно выбирать на основе дополнительных требований, включающих требуемую функцию и т.д., для отбора нейтрализующих антител, а не просто связывающихся с антигеном антител, для отбора антител, которые могут изменять характеристики клеток-мишеней, такие как их каскады передачи сигналов, их форма, их скорость роста, их способность воздействовать на другие клетки, их ответ на воздействие других клеток или других реагентов или на изменение условий, их статус дифференцировки и т.д.

Затем можно получать индивидуальные клоны трансформированных В-клеток из позитивной трансформированной В-клеточной культуры. Стадию клонирования для отделения индивидуальных клонов из смеси позитивных клеток можно осуществлять с использованием серийного разведения, микроманипуляции, отбора единичной клетки с помощью сортировки клеток или другого метода, известного в данной области.

Нуклеиновую кислоту из культивируемых плазматических клеток можно выделять, клонировать и экспрессировать в НЕК293Т-клетках или других известных клетках-хозяевах с использованием методов, известных в данной области.

Клоны иммортализованных В-клеток или трансфектированные клетки-хозяева, предлагаемые в изобретении, можно использовать различными путями, например, в качестве источника моноклональных антител, в качестве источника нуклеиновой кислоты (ДНК или мРНК), кодирующей представляющее интерес моноклональное антитело, для исследований и т.д.

В изобретении предложена также композиция, содержащая иммортализованные В-клетки памяти или трансфектированные клетки-хозяева, которые продуцируют антитела, предлагаемые в настоящем изобретении.

Клон иммортализованных В-клеток или культивируемые плазматические клетки, предлагаемые в изобретении, можно использовать также в качестве источника нуклеиновой кислоты для клонирования генов антител для последующей рекомбинантной экспрессии. Экспрессия из рекомбинантных источников может быть более распространенной для фармацевтических целей по сравнению с экспрессией из В-клеток или гибридом, например, с позиции стабильности, воспроизводимости, простоты культивирования и т.д.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен также способ получения рекомбинантной клетки, включающий стадии, на которых (I) получают одну или несколько нуклеиновых кислот (например, мРНК для тяжелой и/или легкой цепи) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которая(ые) кодирует(ют) представляющее интерес антитело; (II) встраивают нуклеиновую кислоту в экспрессионный вектор и (III) трансфектируют вектором (гетерологичную) клетку-хозяина для обеспечения экспрессии представляющего интерес антитела в указанной клетке-хозяине.

Аналогично этому, в изобретении предложен также способ получения рекомбинантной клетки, включающий стадии, на которых: (I) секвенируют нуклеиновую(ые) кислоту(ы) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которая(ые) кодирует(ют) представляющее интерес антитело; и (II) используют информацию о последовательностях, полученную на стадии (I), для получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) для инсерции в клетку-хозяина для обеспечения экспрессии представляющего интерес антитела в указанной клетке-хозяине. Нуклеиновую кислоту можно, но это не является обязательным, подвергать манипуляциям между стадиями (I) и (II) для интродукции сайтов рестрикции, для изменения предпочтения кодонов и/или для оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных последовательностей.

Кроме того, в изобретении предложен также способ получения трансфектированной клетки-хозяина, включающий стадию трансфекции клетки-хозяина одной или несколькими нуклеиновыми ки-

слотами, которые кодируют представляющее интерес антитело, в котором нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеиновые кислоты, полученные из клона иммортализованных В-клеток или культивируемой плазматической клетки, предлагаемых в изобретении. Указанные процедуры первоначального получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) и последующего их применения для трансфекции клетки-хозяина могут осуществляться в различное время различными людьми и в различных местах (например, в различных странах).

Затем указанные рекомбинантные клетки, предлагаемые в изобретении, можно применять для экспрессии и культивирования. Они являются особенно ценными для экспрессии антител при крупномасштабном фармацевтическом производстве. Их можно применять также в качестве действующего вещества фармацевтической композиции. Можно применять любую приемлемую методику культивирования, включая (но, не ограничиваясь только ими) статическое культивирование, роллерное культивирование во флаконах, культивирование в асцитной жидкости, культивирование в биореакторе с картриджем из полых волокон, культивирование в миниферментере модульного типа, культивирование в реакторе с мешалкой, культивирование на микроносителях, перфузионное культивирование с использованием керамического картриджа и т.д.

Методы получения и секвенирования генов иммуноглобулинов из В-клеток или плазматических клеток хорошо известны в данной области (например, см. главу 4 в Kuby Immunology, 4-е изд., 2000).

Трансфектированная клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, включая клетки дрожжей и животных, прежде всего клетки млекопитающих (например, CHO-клетки, NSO-клетки, человеческие клетки, такие как PER.C6 или НКВ-11, клетки миеломы или клетки печени человека), а также клетки растений. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансфектированная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия хозяев может приводить к гликозилированию антитела, предлагаемого в изобретении, прежде всего с помощью углеводных структур, которые сами не являются иммуногенными для человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансфектированная клетка-хозяин может расти в бессывороточных средах. В других вариантах осуществления изобретения трансфектированная клетка-хозяин может расти в культуре без присутствия продуктов животного происхождения. Трансфектированную клетку-хозяина можно также культивировать с получением клеточной линии.

В изобретении предложен также способ получения одной или нескольких молекул нуклеиновых кислот (например, генов тяжелых и легких цепей), которые кодируют представляющее интерес антитело, включающий стадии, на которых: (I) получают клон иммортализованных В-клеток или культивируют плазматические клетки, предлагаемые в изобретении; (II) получают из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток нуклеиновые кислоты, которые кодируют представляющее интерес антитело. Кроме того, в изобретении предложен способ получения нуклеотидной последовательности, которая кодирует представляющее интерес антитело, включающий стадии, на которых: (I) получают клон иммортализованных В-клеток или культивируют плазматические клетки, предлагаемые в изобретении; (II) секвенируют полученную из клона иммортализованных В-клеток или культивируемых плазматических клеток нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющее интерес антитело.

В изобретении предложен также способ получения молекулы(л) нуклеиновой(ых) кислоты(т), которая(ые) кодирует(ют) представляющее интерес антитело, включающий стадию получения нуклеиновой кислоты, которая происходит из клона трансфектированных В-клеток или культивируемых плазматических клеток, предлагаемых в изобретении. При этом, процедуры первоначального получения клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток и последующего получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток могут осуществляться в различное время различными людьми и в различных местах (например, в различных странах).

Изобретение относится также к способу получения антитела (например, для фармацевтического применения), предлагаемого в настоящем изобретении, включающему стадии, на которых: (I) получают и/или секвенируют одну или несколько нуклеиновых кислот (например, гены тяжелых и легких цепей) из отобранного клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которые экспрессируют представляющее интерес антитело; (II) встраивают нуклеиновую(ые) кислоту(ы) в экспрессионный вектор или применяют нуклеотидную(ые) последовательность(и) для получения экспрессионного вектора; (III) трансфектируют клетку-хозяина, которая может экспрессировать представляющее интерес антитело; (IV) культивируют или субкультивируют трансфектированные клетки-хозяева в условиях, в которых происходит экспрессия представляющего интерес антитела; и необязательно (V) очищают представляющее интерес антитело.

В изобретении предложен также способ получения представляющего интерес антитела, включающий стадии, на которых: культивируют или субкультивируют популяцию трансфектированных клеток-хозяев, например, популяцию стабильно трансфектированных клеток-хозяев, в условиях, происходит экспрессия представляющего интерес антитела, и необязательно очищают представляющее интерес антитело, в котором указанная популяция трансфектированных клеток-хозяев бала получена путем: (I) получения нуклеиновой(ых) кислоты(т), кодирующей(их) отобранное представляющее интерес антитело,

которое получали с использованием клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, полученных согласно описанному выше методу, (II) встраивания нуклеиновой(ых) кислоты(т) в экспрессионный вектор, (III) трансфекции вектором клетки-хозяина, которая может экспрессировать представляющее интерес антитело, и (IV) культивирования или субкультивирования трансфектированной клетки-хозяина, включающей встроенные нуклеиновые кислоты, с получением представляющего интерес антитела. При этом, процедуры первоначального получения рекомбинантной клетки-хозяина и последующего ее культивирования для экспрессии антитела могут осуществляться в различное время различными людьми и в различных местах (например, в различных странах).

В настоящем изобретении предложен также способ снижения иммуногенности антитела, которое содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; способ включает стадию интродукции мутаций M428L и N434S в константную область тяжелой цепи антитела. Для получения мутаций можно использовать описанный выше метод. Как продемонстрировано в примерах, приведенных в настоящем описании, при создании изобретения неожиданно было установлено, что антитело, предлагаемое в изобретении, обладает лишь очень незначительной иммуногенностью, в частности меньшей иммуногенностью по сравнению с антителом без мутаций M428L/N434S. Таким образом, интродукция в антитело указанных мутаций снижает иммуногенность антитела.

Фармацевтическая композиция.

В настоящем изобретении предложена также фармацевтическая композиция, содержащая один или несколько следующих компонентов:

- (I) антитело, предлагаемое в настоящем изобретении;
  - (II) нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, предлагаемое в настоящем изобретении;
  - (III) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении; и/или
  - (IV) клетку, экспрессирующую антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, или содержащую вектор, предлагаемый в настоящем изобретении,
- и необязательно, фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

Иными словами, в настоящем изобретении предложена также фармацевтическая композиция, содержащая антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, и/или клетку, предлагаемую в настоящем изобретении.

Фармацевтическая композиция необязательно может содержать также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Хотя носитель или эксципиент может облегчать введение, он сам не должен индуцировать производство антител, вредных для индивидуума, получающего композицию. Он не должен быть токсичным. Пригодные носители могут представлять собой крупные медленно метаболизирующиеся макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент в фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляет собой компонент, не обладающий активностью в отношении инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

Можно применять фармацевтически приемлемые соли, например, минеральные кислотнo-аддитивные соли, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные субстанции, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или рН-забуферивающие субстанции. Такие носители позволяют приготавливать фармацевтические композиции в форме таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашиц и суспензий для приема внутрь пациентом.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать в различных формах. Например, композиции можно приготавливать в виде инъекционных препаратов, таких как жидкие растворы или суспензии. Можно приготавливать также твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких наполнителях перед инъекцией (например, лиофилизированную композицию, аналогичную Synagis™ и Herceptin® для восстановления с помощью стерильной воды, содержащей консервант). Композицию можно приготавливать для местного применения, например, в виде мази, крема или порошка. Композицию можно приготавливать для орального введения, например, в форме таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композицию можно приготавливать для внутрилегочного введения, например, с помощью ингалятора, с использованием тонкоизмельченного порошка или спрея. Композицию можно приготавливать в форме суппозитория или пессария. Композицию можно приготавливать для назального, ушного или глазного введения, например, в форме капель. Композиция может находиться в форме набора, предназначенного

для восстановления объединенной композиции непосредственно перед введением индивидууму. Например, лиофилизированное антитело можно поставлять в наборе со стерильной водой или стерильным буфером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (единственное) действующее вещество в композиции представляет собой антитело, предлагаемое в настоящем изобретении. Само по себе, оно может быть чувствительным к расщеплению в желудочно-кишечном тракте. Поэтому, если композиция предназначена для введения через желудочно-кишечный тракт, то композиция может содержать агенты, которые защищают антитело от расщепления, но которые высвобождают антитело при его абсорбции из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приведено у Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20-е изд., ISBN: 0683306472.

Значение pH фармацевтических композиций, предлагаемых в изобретении, как правило, составляет от 5,5 до 8,5, в некоторых вариантах осуществления изобретения оно может составлять от 6 до 8, например, примерно 7. Значение pH можно поддерживать с помощью буфера. Композиция может быть стерильной и/или свободной от пирогенов. Композиция может быть изотоничной плазме крови человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, поставляют в герметически запечатанных контейнерах.

Под объем изобретения подпадают композиции, находящиеся в нескольких формах, предназначенных для введения; указанные формы включают (но, не ограничиваясь только ими) формы, пригодные для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Если продукт предназначен для инъекции или инфузии, то он может находиться в форме суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном наполнителе, и он может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие вещества, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, антитело может находиться в безводной форме, предназначенной для восстановления с помощью соответствующей стерильной жидкости перед применением.

Под наполнителем, как правило, подразумевают материал, который можно применять для хранения, транспортировки и/или введения соединения, такого как фармацевтическое действующее вещество, прежде всего, антитела, предлагаемого в настоящем изобретении. Например, наполнитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, которую можно применять для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтического действующего вещества, прежде всего, антител, предлагаемых в настоящем изобретении. После приготовления композиции, предлагаемые в изобретении, можно вводить непосредственно индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции адаптированы для введения млекопитающим, например, людям.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить любым из многочисленных путей, включая (но, не ограничиваясь только ими) оральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, внутрибрюшинный, подоболочечный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный путь введения, местное применение, подкожный, интраназальный, энтеральный, подъязычный, внутриматочный или ректальный путь введения. Для введения фармацевтических композиций, предлагаемых в изобретении, можно применять также безыгольный шприц. Фармацевтическую композицию необязательно можно приготавливать для орального введения, например, в форме таблеток, капсул и т.п., для местного применения или в форме инъекционного препарата, например, в форме водных растворов или суспензий. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой инъекционный препарат. Под объем изобретения подпадают также твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких наполнителях перед инъекцией, например, фармацевтическая композиция может находиться в лиофилизированной форме.

Для инъекции, например, для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в область повреждения действующее вещество может находиться в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, свободного от пирогенов и имеющего пригодные значение pH, изотоничность и стабильность. Специалистам в данной области хорошо известны методы приготовления пригодных растворов с использованием, например, изотоничных наполнителей, таких как инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный лактированный раствор Рингера. При необходимости можно включать консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Когда действующее вещество представляет собой антитело, пептид, молекулу нуклеиновой кислоты или другое пригодное для фармацевтических целей соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, которое предназначено для введения индивидууму, то введение, как правило, осуществляют в "профилактически эффективном количестве" или в "терапевтически эффективном количестве" (в зависимости от обстоятельств), которое достаточно для оказания благоприятного действия на индивидуума. Фактически отостояемое количество, а также скорость и график введения должны зависеть от природы и серьезности состояния, подлежащего лечению. Для инъекции фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может находиться, например, в предварительно заполненном шприце.

Предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию, указанную выше, можно вводить также орально в любой приемлемой для орального введения лекарственной форме, включая (но, не ограничиваясь только ими) капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для орального применения обычные используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Как правило, добавляют также замасливатели, такие как стеарат магния. Для орального введения в форме капсул пригодные разбавители включают лактозу и безводный кукурузный крахмал. Когда для орального применения требуются водные суспензии, то действующее вещество, т.е. предлагаемую в изобретении молекулу, конъюгированную с карго-транспортёром, указанную выше, объединяют с эмульгаторами и суспендирующими агентами. При необходимости можно добавлять также определенные подслащающие вещества, корригенты или красители.

Предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно применять также местно, особенно в том случае, когда мишень для лечения включает области или органы, легкодоступные для местной обработки, например, включает доступную эпителиальную ткань. Для каждой/каждого из таких областей или органов можно легко приготавливать пригодные для местного применения препаративные формы. Для местного применения предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно приготавливать в форме пригодной мази, содержащей предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию, прежде всего ее компоненты, указанные выше, суспендированные или растворенные в одном или нескольких носителях. Носители для местного применения включают (но, не ограничиваясь только ими) минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, производные полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно этому, предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно приготавливать в форме пригодного лосьона или крема. В контексте настоящего изобретения пригодные носители включают (но, не ограничиваясь только ими) минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, воск на основе сложных цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Введение лекарственного средства можно осуществлять согласно схеме введения однократной дозы или схеме введения многократных доз. В частности, фармацевтическую композицию можно поставлять в форме продукта, содержащего однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество антитела в фармацевтической композиции, прежде всего в том случае, если она поставляется в форме продукта, содержащего однократную дозу, не превышает 200 мг, например, не превышает 100 или 50 мг.

Например, фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводит ежедневно, например, один или несколько раз в день, например, один, два, три или четыре раза в день, в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 или большего количества дней, например, ежедневно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить еженедельно, например один или два раза в неделю, в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 или большего количества недель, например, еженедельно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или еженедельно в течение 2, 3, 4 или 5 лет. Кроме того, фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить ежемесячно, например, один раз в месяц или через месяц в течение 1, 2, 3, 4 или 5 или большего количества лет. Введение можно продолжать также в течение всей жизни. В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматривается также только одно единственное введение, в частности, при определенных показаниях, например, для профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа А. Например, осуществляют одно введение (единичную дозу), а дополнительные дозы можно вводить в один или несколько более поздних моментов времени, когда титр антитела является недостаточным или предполагается, что является недостаточным, для защиты.

В случае применения однократной дозы, например, ежедневной, еженедельной или ежемесячной дозы, количество антитела в фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может не превышать 1 г или 500 мг. В некоторых вариантах осуществления изобретения в случае применения однократной дозы количество антитела в фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может не превышать 200 или 100 мг. Например, в случае применения однократной дозы количество антитела в фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может не превышать 50 мг.

Фармацевтические композиции, как правило, включают в "эффективном" количестве одно или несколько антител, предлагаемых в изобретении, т.е. в количестве, достаточном для лечения, облегчения, ослабления, снижения или предупреждения рассматриваемого заболевания или состояния, или для достижения поддающегося обнаружению терапевтического действия. Терапевтические действия включают также снижение или ослабление патогенной активности или физических симптомов. Точное эффективное количество для любого конкретного индивидуума должно зависеть от его конституции, веса и состояния здоровья, природы и серьезности состояния и терапевтических препаратов или комбинации терапевтических препаратов, выбранных для введения. Эффективное количество для конкретной ситуации определяют путем стандартных экспериментов, и его определение находится в компетенции практи-

кующего врача. Для целей настоящего изобретения эффективная доза, как правило, может составлять от примерно 0,005 до примерно 100 мг/кг, например, от примерно 0,0075 до примерно 50 мг/кг или от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективная доза предлагаемого в настоящем изобретении антитела (например, количество антитела в фармацевтической композиции) может составлять от примерно 0,02 до примерно 5 мг/кг в пересчете на вес тела (например, в кг) индивидуума, которому ее вводят.

Кроме того, фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать также дополнительный активный компонент, который может представлять собой другое антитело или компонент, не являющийся антителом. Например, фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько противовирусных препаратов (которые не являются антителами). Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать также одно или несколько антител (которые не представляют собой антитела, предлагаемые в изобретении), например, антитело против других антигенов вируса гриппа (отличных от гемагглютинина) или антитело против другого вируса гриппа (например, против вируса гриппа В или против вируса гриппа С). Таким образом, фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать один или несколько дополнительных активных компонентов.

Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, может присутствовать либо в той же фармацевтической композиции, что и дополнительный активный компонент, или в альтернативном варианте антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, может содержаться в первой фармацевтической композиции, а дополнительный активный компонент может содержаться во второй фармацевтической композиции, отличной от первой фармацевтической композиции. Таким образом, если предусматривается более одного дополнительного активного компонента, то каждый дополнительный активный компонент и антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, могут содержаться в различных фармацевтических композициях. Такие различные фармацевтические композиции можно вводить или вместе/одновременно, или в различные моменты времени, или в различные области (например, в различные части организма).

Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, и дополнительный активный компонент могут оказывать дополнительное терапевтическое действие, такое как синергетическое терапевтическое действие. Понятие "синергизм" применяют для обозначения объединенного действия двух или большего количества действующих веществ, которое превышает сумму индивидуальных действий каждого из соответствующих действующих веществ. Так, когда объединенное действие двух или большего количества агентов приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, это означает, что ингибирование активности или процесса превышает сумму ингибирующих действий каждого из соответствующих действующих веществ. Понятие "синергетическое терапевтическое действие" относится к терапевтическому действию, наблюдаемому при объединении двух или большего количества терапий, если терапевтическое действие (оцениваемое любым количеством параметров) превышает сумму индивидуальных терапевтических действий, наблюдаемых при применении соответствующих индивидуальных терапий.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, предлагаемая в изобретении, может включать антитела, предлагаемые в изобретении, причем на долю антител может приходиться по меньшей мере вплоть до 50 мас.% (например, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) от общего содержания белка в композиции. В композиции, предлагаемой в изобретении, антитела могут находиться в очищенной форме.

В настоящем изобретении предложен также способ получения фармацевтической композиции, включающий стадии, на которых: (I) получают антитело, предлагаемое в изобретении; и (II) смешивают очищенное антитело с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

В других вариантах осуществления изобретения способ получения фармацевтической композиции включает стадию, на которой: смешивают антитело с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, где антитело представляет собой моноклональное антитело, которое получают из трансформированной В-клетки или из культивируемой плазматической клетки, предлагаемой в изобретении.

В качестве альтернативы доставки в терапевтических целях антител или В-клеток можно осуществлять доставку нуклеиновой кислоты (как правило, ДНК), которая кодирует представляющее интерес моноклональное антитело, полученное из В-клетки или из культивируемой плазматической клетки, в организм индивидуума, так, чтобы нуклеиновая кислота могла экспрессироваться *in situ* в организме индивидуума с достижением требуемого терапевтического действия. Пригодная для указанной цели генная терапия и векторы для доставки нуклеиновой кислоты известны в данной области.

Фармацевтические композиции могут включать антимикробные препараты, прежде всего в том случае, когда их упаковывают в мультидозовом формате. Они могут содержать детергенты, например, Твин (полисорбат), такой как Твин 80. Детергенты, как правило, присутствуют в низких концентрациях, например, менее чем 0,01%. Композиции могут содержать также соли натрия (например, хлорид натрия) для обеспечения тоничности. Например, как правило, концентрация NaCl составляет  $10 \pm 2$  мг/мл.

Кроме того, фармацевтические композиции могут содержать сахарный спирт (например, маннит)

или дисахарид (например, сахарозу или трегалозу), например, в концентрации примерно 15-30 мг/мл (например, 25 мг/мл), прежде всего в том случае, когда они подлежат лиофилизации или когда они включают материал, восстановленный из лиофилизированного материала. Значение pH композиции, предназначенной для лиофилизации, можно доводить перед лиофилизацией до уровня, находящегося между 5 и 8 или между 5,5 и 7, или составляющего примерно 6,1.

Композиции, предлагаемые в изобретении, могут содержать также один или несколько иммунорегуляторных агентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько иммунорегуляторных агентов включает(ют) адьювант.

Медицинское лечение и применения.

Следующим объектом настоящего изобретения является применение антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, для (I) профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А; или для (II) диагностирования инфекции, вызываемой вирусом гриппа А. Таким образом, в настоящем изобретении предложен также способ снижения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, или снижения риска инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, включающий: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, в терапевтически эффективном количестве антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Кроме того, в настоящем изобретении предложено также применение антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства для профилактики, лечения или ослабления инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

Методы диагностирования могут включать приведение антитела в контакт с образцом. Такие образцы можно выделять из организма индивидуума, например, могут представлять собой выделенный образец ткани, взятый, например, из носовых проходов, синусовых пазух, слюнных желез, легкого, печени, поджелудочной железы, почки, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, головного мозга, кожи или крови, например, плазмы или сыворотки. Методы диагностики могут включать также обнаружение комплекса антиген/антитело, прежде всего после контакта антитела с образцом. Такую стадию обнаружения, как правило, осуществляют в лаборатории, т.е. без контакта с телом человека или животного. Примеры методов обнаружения хорошо известны специалистам в данной области и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Профилактика инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, относится, прежде всего, к профилактическим мероприятиям, если у индивидуума не диагностирована инфекция, вызываемая вирусом гриппа А (либо диагностирование не осуществляли, либо результаты диагностирования были отрицательными), и/или у индивидуума не проявляются симптомы инфекции, вызываемой вирусом гриппа А. Профилактика инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, является особенно важной для индивидуумов, имеющих при заражении повышенный риск серьезного заболевания или осложнений, таких как беременные женщины, дети (например, дети возрастом менее 59 месяцев), престарелые люди, индивидуумы с хроническими медицинскими состояниями (такими как сердечно-сосудистые, легочные, почечные, метаболические, нервно-психические, печеночные или гематологические заболевания) и индивидуумы с иммуносупрессивными состояниями (такими как ВИЧ/СПИД, получающие химиотерапию или стероиды или со злокачественными заболеваниями). Кроме того, профилактика инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, является особенно важной для индивидуумов, имеющих повышенный риск заражения вирусом гриппа А, например, в результате повышенного контакта, например, индивидуумы, работающие или находящиеся в общественных местах, в частности, медицинские работники.

В отличие от этого, в случае терапевтических мероприятий индивидуум, как правило, инфицирован вирусом гриппа А, у него диагностирована инфекция, вызываемая вирусом гриппа А, и/или проявляются симптомы инфекции, вызываемой вирусом гриппа А. Следует отметить, что понятия "лечение" и "терапия"/"терапевтические мероприятия" в отношении инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, включают (полное) излечение, а также ослабление/уменьшение инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, или связанных с ней симптомов.

Таким образом, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно применять для лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, у индивидуумов, у которых диагностирована инфекция, вызываемая вирусом гриппа А, или у индивидуумов, которые имеют симптомы инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоя-

шем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно применять также для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, у бессимптомных индивидуумов. У указанных индивидуумов инфекция, вызываемая вирусом гриппа А, может быть диагностирована или не диагностирована.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум, подлежащий лечению (например, в рамках профилактических или терапевтических мероприятий, указанных выше) страдает аутоиммунным заболеванием или аллергией; или имеет риск развития аутоиммунного заболевания или аллергии. Индивидуумы, имеющие риск развития аутоиммунного заболевания или аллергии, включают индивидуумов, которые имеют членов семьи с аутоиммунными заболеваниями и/или аллергиями, и индивидуумов (регулярно) подвергающихся воздействию аллергенов. Как продемонстрировано в примерах, представленных в настоящем описании, при создании изобретения неожиданно было установлено, что антитело, предлагаемое в изобретении, обладает лишь очень незначительной иммуногенностью, в частности, меньшей иммуногенностью по сравнению с антителом без мутаций M428L/N434S. Таким образом, антитело, предлагаемое в изобретении, может быть особенно ценным для индивидуумов, имеющих риск выраженных иммунных ответов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, применяют для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до трех месяцев до (возможного) заражения вирусом гриппа А, например, вплоть до двух недель до (возможного) заражения вирусом гриппа А или вплоть до одной недели до (возможного) заражения вирусом гриппа А. Например, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, применяют для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до одного дня до (возможного) заражения вирусом гриппа А. Указанный режим обработки относится прежде всего к профилактическим мероприятиям.

Кроме того, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно применять для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до трех месяцев до проявления первого симптома заражения вирусом гриппа А или вплоть до одного месяца до проявления первого симптома заражения вирусом гриппа А, например, вплоть до двух недель до проявления первого симптома заражения вирусом гриппа А или вплоть до одной недели до проявления первого симптома заражения вирусом гриппа А. Например, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, применяют для профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при этом антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят заранее вплоть до трех дней или до двух дней до проявления первого симптома заражения вирусом гриппа А.

Как правило, после первого введения антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно осуществлять одно или несколько последующих введений, например, используя одну дозу в день или через день в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 дней или 21 дня. После первого введения антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно осуществлять одно или несколько последующих введений, например, используя одну дозу однократно или дважды в неделю в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 недель или 21 недели. После первого введения антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно осуществлять одно или несколько последующих введений, например, используя одну дозу каждые 2 или 4 недели в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 недель или 21 недели. После первого введения антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора,

предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно осуществлять одно или несколько последующих введений, например, используя одну дозу каждые два или четыре месяца в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 месяцев или 21 месяца. После первого введения антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно осуществлять одно или несколько последующих введений, например, используя одну дозу один и два раза в год в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят в виде (однократной) дозы, составляющей от 0,005 до 100 мг/кг веса тела или от 0,0075 до 50 мг/кг веса тела, например, (однократной) дозы, составляющей от 0,01 до 10 мг/кг веса тела или в виде (однократной) дозы, составляющей от 0,05 до 5 мг/кг веса тела. Например, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят в виде (однократной) дозы, составляющей от 0,1 до 1 мг/кг веса тела.

Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить любым из многочисленных путей, такими как оральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, внутрибрюшинный, подоболочечный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный путь введения, местное применение, подкожный, интраназальный, энтеральный, подъязычный, внутриматочный или ректальный путь введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят профилактически, т.е. до диагностирования заражения вирусом гриппа А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, вводят в дозе, не превышающей половину дозы, требуемой для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации М428L и N434S в константной области тяжелой цепи. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, вводят в дозе, не превышающей одну треть, одну четвертую, одну пятую, одну шестую, одну седьмую, одну восьмую или одну девятую дозы, требуемой для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации М428L и N434S в константной области тяжелой цепи. В примере 5, представленном в настоящем описании, продемонстрировано, что антитело, предлагаемое в изобретении, которое содержит мутации М428L и N434S в константной области тяжелой цепи, является эффективным в значительно более низких дозах относительно применяемого для сравнения антитела, которое отличается от предлагаемого в изобретении антитела только тем, что не содержит мутации М428L и N434S в константной области тяжелой цепи. В примере 5 продемонстрировано также, что повышенная эффективность антитела, предлагаемого в изобретении, не зависит от уровней антитела в кровотоке.

Таким образом, антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить индивидуумам, имеющим непосредственный риск заражения вирусом гриппа А. Непосредственный риск заражения вирусом гриппа А, как правило, имеет место во время эпидемии гриппа А. Известно, что вирусы гриппа А могут циркулировать и вызывать сезонные эпидемии болезни (WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 6 ноября, 2018 г.). В умеренном климате сезонные эпидемии главным образом происходят зимой, в то время как в тропических областях грипп может встречаться в течение всего года, вызывая более нерегулярные вспышки. Например, в северном полушарии риск эпидемии гриппа А является высоким в ноябре, декабре, январе, феврале и марте, а в южном полушарии риск эпидемии гриппа А является высоким в мае, июне, июле, августе и сентябре.

Комбинированная терапия.

Введение антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, согласно способам и вариантам применения, предлагаемым в изобретении, можно осуществлять индивидуально или в комбинации с коагентом (который обозначают также в контексте настоящего описания как "дополнительный активный компонент"), который может быть полезным для предупреждения и/или ле-

чения гриппозной инфекции.

Под объем изобретения подпадает также введение антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, когда их вводят индивидууму до, одновременно или после введения коагента или осуществления другого терапевтического режима, полезного для лечения и/или предупреждения гриппа. Указанные антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию, которые применяют в комбинации с указанным коагентом, можно вводить в одной и той композиции или в различных композициях и с использованием одного и того же пути введения или различных путей введения. В контексте настоящего понятия типа "комбинированная терапия", "совместное введение", "введение в сочетании друг с другом" и т.п. служат для обозначения совместного действия лекарственных средств (которые следует вводить "в комбинации"). Для этой цели объединенные лекарственные средства, как правило, присутствуют в месте действия одновременно и/или в перекрывающемся временном окне. Возможен также вариант, при котором действия, запускаемые одним из лекарственных средств, все еще продолжаются (даже, если само лекарственное средство может уже не присутствовать) в момент введения другого лекарственного средства, в результате чего действия обоих лекарственных средств могут объединяться. Однако, если лекарственное средство, вводили задолго до другого лекарственного средства (например, более чем за один, два, три или большее количество месяцев или за год), в результате чего оно уже не присутствовало (или его действия не продолжалось), то введение другого лекарственного средства, как правило, не рассматривается как введение "в комбинации". Например, лекарственная терапия, применяемая в другие сезоны гриппа, как правило, не относится к применяемой "в комбинации".

Указанные другие терапевтические режимы или коагенты могут, например, быть противовирусными. Антивирусный препарат (или "антивирусный агент" или "антивирусное лекарственное средство") относится к классу лекарственной терапии, применяемой конкретно для лечения вирусных инфекций. Аналогично антибиотикам для бактерий, антивирусные препараты могут обладать широким спектром антивирусного действия в отношении различных вирусов или могут представлять собой специфические антивирусные препараты, которые применяют в отношении конкретных вирусов. В отличие от большинства антибиотиков антивирусные лекарственные средства, как правило, не разрушают их патоген-мишень; вместо этого они обычно ингибируют его развитие.

Таким образом, согласно другому объекту настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, или фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят в комбинации (до, одновременно или после) антивирусного препарата для (медицинских) применений, указанных в настоящем описании.

Как правило, антивирусные препарат может представлять собой антивирусный препарат широкого спектра действия (который можно применять в отношении вирусов гриппа и других вирусов) или антивирусный препарат, специфический в отношении вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антивирусный препарат не представляет собой антитело. Например, антивирусный препарат может представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство. Примеры низкомолекулярных лекарственных средств, которые можно применять для профилактики и/или лечения гриппа, описаны у Wu X., Wu X., Sun Q и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics.* 7(4), 2017, с. 826-845. Из сведений, представленных Wu с соавторами, 2017 г., специалисту в данной области известны различные антивирусные препараты, которые можно применять для профилактики и/или лечения гриппа. Другие антивирусные препараты, которые можно применять при гриппе, описаны у Davidson S. *Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. Front Immunol.* 9, 2018, с.1946; и у Kozsalka P., Tilmanis D., Hurt A.C. *Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. Influenza Other Respir Viruses.* 11(3), 2017, с. 240-246.

Антивирусные препараты, которые можно применять для профилактики и/или лечения гриппа, включают (I) агенты, мишенью которых являются функциональные белки самого вируса гриппа, и (II) агенты, мишенью которых являются клетки-хозяева, например, эпителиальные клетки.

Агенты, таргетирующие клетки-хозяева, включают антивирусные препараты широкого спектра действия из класса тиазолидов, слитые с сиалидазой белки, интерфероны типа III, ингибиторы Bcl-2 (В-клеточной лимфомы 2), ингибиторы протеазы, ингибиторы V-АТФаза и антиоксиданты. Примеры антивирусных препаратов широкого спектра действия из класса тиазолидов включают нитазоксанид (NTZ), который быстро деацетируется в крови до активной метаболической формы, такой как тизоксанид (TIZ), и второе поколение тиазолидных производных, структуры которых родственны NTZ, таких как RM5061. Флудаза (DAS181) является примером слитых с сиалидазой белков. IFN типа III включают, например, IFNλ. Примеры ингибиторов Bcl-2 включают (но, не ограничиваясь только ими) АВТ-737, АВТ-263, АВТ-199, WENI-539 и А-1331852 (Davidson S. *Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. Front Immunol.* 9, 2018, с. 1946). Примеры ингибиторов протеаз включают нафамостат, леупептин,

эпсилон-аминокапроновую кислоту, камостат и апротинин. Ингибиторы V-АТФазы включают Norakin®, Parkoran®, Antiparkin® и Akineton®. Примером антиоксиданта является альфа-токоферол.

В некоторых вариантах осуществления изобретения противовирусный препарат представляет собой агент, таргетирующий функциональный белок самого вируса гриппа. Например, противовирусный препарат может таргетировать функциональный белок вируса гриппа, который не представляет собой гемагглютинин. В целом, противовирусные препараты, таргетирующие функциональный белок вируса гриппа, включают ингибиторы проникновения, ингибиторы гемагглютинина, ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы полимеразы вируса гриппа (ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp)), ингибиторы нуклеокапсидного белка, ингибиторы ионного М2-канала и гидрохлорид арбидола. Примеры ингибиторов проникновения включают (но, не ограничиваясь только ими) производные тритерпеноидов, такие как глицирризиновая кислота (глицирризин) и глицерретиновая кислота; сапонины; уралсапонины М-У (такие как уралсапонины М); декстрансульфат (DS); силимарин; куркумин и лизосоматропные агенты, такие как конканамицин А, бафиломицин А1 и хлороквин. Примеры ингибиторов гемагглютинина включают (но не ограничиваясь только ими) ВМУ-27709; стахифлин; встречающиеся в естественных условиях продукты, такие как госсипол, рутин, кверцетин, ксилонин и теафлавины; трехвалентные миметики гликопептидов, такие как соединение 1, описанное у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 7(4), 2017, с. 826-845*; производные подокаприновой кислоты, такие как соединение 2, описанное у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*; природный продукт пентациклических тритерпеноидов, такой как соединение 3, описанное у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*; и пренилированные индолдикетопиперазиновые алкалоиды, такие как неохинолин В. Примеры ингибиторов нуклеокапсидного белка включают (но, не ограничиваясь только ими) нуклеозин, циклогексимид, напроксен и ингавирин. Примеры ингибиторов ионного М2-канала включают (но, не ограничиваясь только ими) разрешенные для применения ингибиторы М2 амантадин и римантадин и их производные; а также соединения, не относящиеся к производным адамантанов, такие как производные спермина, спермидина, спиропиперидина и пинанамина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения противовирусный препарат выбирают из ингибиторов нейраминидазы (NA) и ингибиторов полимеразы вируса гриппа (ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp)). Примеры ингибиторов нейраминидазы (NA) включают (но, не ограничиваясь только ими) занамивир; осельтамивир; перамивир; ланинамивир; их производные, такие как соединения 4-10, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*; и димерные конъюгаты занамивира (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*; производные бензойной кислоты (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*, например соединения 11-14); пирролидиновые производные (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*, такие как соединения 15-18); конъюгаты гинкгетин-сиаловая кислота; флаваноиды и флавоноиды изоскуттеллареин и его производные (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*); AV5080; и N-замещенные аналоги осельтамивира (например, описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*). Примеры ингибиторов полимеразы вируса гриппа включают (но, не ограничиваясь только ими) (ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp)) RdRp-разрушающие соединения, такие как описанные у Wu X., Wu X., Sun Q. и др. *Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, с. 826-845*; PB2-специфические ингибиторы связывания кэпа, такие как JNJ63623872 (VX-787); кэп-зависимые ингибиторы эндонуклеазы, такие как балоксавир марбоксил (S-033188); ингибиторы PA-эндонуклеазы, такие как AL-794, EGCG (галат эпигаллокатехина) и его альфатические аналоги, N-гидроксамовые кислоты и N-гидроксиимиды, флутимид и его ароматические аналоги, производные тетрамовой кислоты, L-742,001, ANA-0, полифенольные катехины, аналоги фенетилфенилфталимидов, макроциклические бисбензилы, пиримидинолы, фуллерены, гидроксихинолиноны, гидроксипиридиноны, гидроксипиридазиноны, несущие тригидроксифенил соединения, 2-гидроксибензамиды, гидроксипиримидиноны, β-дикетокислоты и их биоизостерические производные, тиосемикарбазоны, бисдигидроксииндолкарбокаамиды и пиридопиперазиндионы (Endo-1); и ингибиторы нуклеозидов и аналогов азотистых оснований, такие как рибавирин, фавипиравир (T-705), 2'-дезоксидефторгуанозин (2'-FdG), 2'-замещенные аналоги карбануклеозидов, 6-метил-7-замещенные-7-дезапуриновые нуклеозидные аналоги и 2'-дезоксидефторцитидин (2'-FdC). Например, противовирусный препарат может представлять собой занамивир, осельтамивир или балоксавир.

Таким образом, фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может со-

держат один или несколько дополнительных активных компонентов. Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, может присутствовать в той же фармацевтической композиции, что дополнительный активный компонент (коагент). Альтернативно этому, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, и дополнительный активный компонент (коагент) входят в различные фармацевтические композиции (например, не в одну и ту же композицию). Таким образом, если предполагается применение нескольких дополнительных активных компонентов (коагентов), то каждый дополнительный активный компонент (коагент) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, могут содержаться в различных фармацевтических композициях. Указанные различные фармацевтические композиции можно вводить или совместно/одновременно, либо в различные моменты времени, и/или с помощью различных путей введения.

Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, и дополнительный активный компонент (коагент) могут оказывать дополнительное или синергетическое терапевтическое действие. Понятие "синергизм" применяют для обозначения объединенного действия двух или большего количества действующих веществ, которое превышает сумму индивидуальных действий каждого из соответствующих действующих веществ. Так, когда объединенное действие двух или большего количества действующих веществ приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, это означает, что ингибирование активности или процесса превышает сумму ингибирующих действий каждого из соответствующих действующих веществ. Понятие "синергетическое терапевтическое действие" относится к терапевтическому действию, наблюдаемому при объединении двух или большего количества терапий, если терапевтическое действие (оцениваемое любым количеством параметров) превышает сумму индивидуальных терапевтических действий, наблюдаемых при применении соответствующих индивидуальных терапий.

Таким образом, в настоящем изобретении предложена также комбинация (I) антитела, предлагаемого в изобретении, указанного в настоящем описании, и (II) противовирусного агента, описанного выше.

#### **Краткое описание чертежей**

Ниже представлено краткое описание прилагаемых чертежей. Чертежи предназначены для более подробной иллюстрации настоящего изобретения. Однако они никоим образом не направлены на ограничение сущности изобретения.

На чертежах показано:

на фиг. 1 - представленные в примере 2 данные о концентрации человеческих антител FluABMLNS (незакрашенные кружки) и FluABwt (применяемое для сравнения антитело; закрашенные кружки) в образцах плазмы макака, измеренные методом ELISA, в течение периода времени вплоть до дня 56;

на фиг. 2 - представленные в примере 3 данные о концентрации в плазме FluAB\_MLNS (животные C90142, C90190), полученные методом ELISA с использованием антитела к CH2 для количественной оценки уровня общего человеческого МАт или связывания антигена НА с целью определения функциональности МАт. На графике представлены обработанные методом линейной регрессии зависимости между количественной оценкой уровня общего человеческого МАт и уровнем связывания НА для отдельных животных в выбранные моменты времени (дни 1, 21, 56, 86 и 113);

на фиг. 3 - представленные в примере 4 (А) данные о концентрации человеческих антител FluAB\_MLNS и FluAB\_wt в мазках из носа, измеренные методом ELISA и стандартизованные относительно содержания мочевины; и (Б) данные о биораспределении человеческих антител FluAB\_MLNS и FluAB\_wt в виде выраженного в % соотношения концентраций, стандартизованных относительно содержания мочевины, в мазках из носа и в плазме. Ниже указаны ID индивидуальных животных и вариант применяемого для инокуляции человеческого антитела (FluAB\_MLNS или FluAB\_wt);

на фиг. 4 - представленная в примере 5 зависимость от времени кумулятивного изменения веса тела (BW) мышей линии Tg32, которых обрабатывали либо FluAB\_wt (панели Б, Г, кружки), либо FluAB\_MLNS (панели В, Д, квадраты) в дозе 1 мг/кг (панели Б, В, серые символы) и 0,3 мг/кг (панели Г, Д, светло-серые символы), либо оставляли без обработки (панель А, треугольники); всех мышей заражали интраназально вирусом PR8. Представлены данные для индивидуальных животных; жирной черной линией обозначена средняя зависимость  $BW \pm SD$ . Указано количество особей на группу. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  при сравнении только с контролем (А), ° $p < 0,05$ , °° $p < 0,01$ , во всех случаях при сравнении с обработанными антителом MEDI8852 животными в соответствующие моменты времени, 2-сторонний дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений;

на фиг. 5 - представленные в примере 5 результаты сравнения % выживаемости зараженных самцов мышей линии Tg32, которых либо не подвергали обработке (пунктирная линия), либо обрабатывали дозой 1 мг/кг (левая панель) или дозой 0,3 мг/кг (правая панель) FluAB\_wt или FluAB\_MLNS. \*\* $p < 0,01$  при сравнении с необработанными мышами (CTR) и обработанными FluAB\_MLNS в дозе 0,3 мг/кг; °°° $p < 0,001$  при сравнении с обработкой FluAB\_wt, логранговый анализ, метод Мантеля-Кокса;

на фиг. 6 - представленные в примере 5 данные об уровнях циркулирующих инъецированных антител. Представлены индивидуальные циркулирующие уровни (мкг/мл) уровнях FluAB\_wt (кружки) и FluAB\_MLNS (квадраты), измеренные в сыворотке мышей непосредственно до (день 0) и через 6 дней после заражения. Столбиками показаны средние значения  $\pm SD$ ;

на фиг. 7 - схема планшета, описанная в примере 6, которую использовали в анализе нейтрализации *in vitro*;

на фиг. 8 - представленные в примере 6 данные о нейтрализующей активности FluAB\_MLNS и осельтамивира при их индивидуальном применении в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1N1 (А, В) и H3N2 (Б, Г);

на фиг. 9 - представленные в примере 6 данные об объединенной нейтрализующей активности FluAB\_MLNS и осельтамивира в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1 (А) и H3 (Б). Данные представлены в виде относительных уровней ингибирования вызываемой вирусами H1N1 (А) и H3N2 (В) инфекции на MDCK-клетках, обусловленных FluAB\_MLNS при его индивидуальном применении и FluAB\_MLNS в комбинации с взятым в гетеромолярных концентрациях осельтамивиром. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD, полученных по трем повторностям, каждую повторность получали с использованием трех независимых культуральных планшетов;

на фиг. 10 - описанные в примере 6 графики медианного эффекта комбинаций FluAB\_MLNS и осельтамивира. Два соединения серийно разводили в указанных постоянных соотношениях и добавляли к MDCK-клеткам, зараженным либо штаммом H1 вируса (А), либо штаммом H3 вируса (Б). Представлены также значения, полученные при использовании выбранных комбинаций в непостоянных соотношениях (NCR);

на фиг. 11 - представленные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB\_MLNS и осельтамивира в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 12 - описанные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB\_MLNS и осельтамивира в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 13 - описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB\_MLNS-осельтамивир в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точками обозначены значения IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> и IC<sub>90</sub> для комбинаций FluAB\_MLNS-осельтамивир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 14 - описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB\_MLNS-осельтамивир в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точками обозначены значения IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> и IC<sub>90</sub> для комбинаций FluAB\_MLNS-осельтамивир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 15 - представленные в примере 6 данные о нейтрализующей активности FluAB\_MLNS и занамивира при их индивидуальном применении в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1N1 (А, В) и H3N2 (Б, Г);

на фиг. 16 - представленные в примере 6 данные об объединенной нейтрализующей активности FluAB\_MLNS и занамивира в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1 (А) и H3 (Б). Данные представлены в виде относительных уровней ингибирования вызываемой вирусами H1N1 (А) и H3N2 (В) инфекции MDCK-клеток, обусловленного FluAB\_MLNS при его индивидуальном применении и FluAB\_MLNS в комбинации с взятым в гетеромолярных концентрациях занамивиром. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD, полученных по трем повторностям, каждую повторность получали с использованием трех независимых культуральных планшетов;

на фиг. 17 - описанные в примере 6 графики медианного эффекта комбинации FluAB\_MLNS и занамивира. Два соединения серийно разводили в указанных постоянных соотношениях и добавляли к клеткам линии MDCK, зараженным либо штаммом вируса H1 (А), либо штаммом вируса H3 (Б). Представлены также значения, полученные при использовании выбранных комбинаций в непостоянных соотношениях (NCR);

на фиг. 18 - представленные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих действие FluAB\_MLNS и занамивира в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 19 - описанные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих FluAB\_MLNS и занамивира в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции, полученные согласно процедуре, описанной в примере 6. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения,

полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 20 - описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB\_MLNS-занамибир в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точками обозначены значения  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  для комбинаций FluAB\_MLNS-занамибир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 21 - описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB\_MLNS-занамибир в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точками обозначены значения  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  для комбинаций FluAB\_MLNS-занамибир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 22 - представленные в примере 6 данные о нейтрализующей активности FluAB\_MLNS и балоксавира при их индивидуальном применении в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1N1 (А, В) и H3N2 (Б, Г);

на фиг. 23 - представленные в примере 6 данные об объединенной нейтрализующей активности FluAB\_MLNS и балоксавира в отношении инфекции, вызываемой вирусом H1 (А) и H3 (Б). Данные представлены в виде относительных уровней ингибирования вызываемой вирусами H1N1 (А) и H3N2 (Б) инфекции MDCK-клеток, обусловленного FluAB\_MLNS при его индивидуальном применении и FluAB\_MLNS в комбинации с взятым в гетеромолярных концентрациях балоксавиром. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD, полученных по трем повторностям, каждую повторность получали с использованием трех независимых культуральных планшетов;

на фиг. 24 - описанные в примере 6 графики медианного эффекта комбинации FluAB\_MLNS и балоксавира. Два соединения серийно разводили в указанных постоянных соотношениях и добавляли к MDCK-клеткам, зараженным либо штаммом вируса H1 (А), либо штаммом вируса H3 (Б). Представлены также значения, полученные при использовании выбранных комбинаций в непостоянных соотношениях (NCR);

на фиг. 25 - описанные в примере 6 данные о комбинационных индексах, характеризующих FluAB\_MLNS и балоксавира в отношении вызываемой вирусом H1N1 инфекции. Точки представляют собой фактические экспериментальные значения, полученные при указанных постоянных соотношениях, сбоку указана объединенная концентрация комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Пунктирными кривыми показан предсказанный комбинационный индекс во всем диапазоне действия;

на фиг. 26 - описанные в примере 6 изоболограммы, характеризующие действие комбинаций FluAB\_MLNS-балоксавир в отношении вызываемой вирусом H3N2 инфекции. Точками обозначены значения  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  для комбинаций FluAB\_MLNS-балоксавир при различных постоянных соотношениях. Для каждой экспериментальной точки указана объединенная концентрация;

на фиг. 27 - представленные в примере 7 данные о связывании человеческого FcRn в растворе с иммобилизованным FluAB\_MLNS (серая линия) или FluAB\_wt (черная линия), полученные с помощью системы Octet при pH 6,0 (А) или pH 7,4 (Б). Момент времени 0 с представляет собой момент времени, в который осуществляли переход от исходного буфера к буферу, содержащему человеческий FcRn. Момент времени 420 с (серая пунктирная вертикальная линия) представляет собой момент времени, в который осуществляли переход на "пустой" буфер при соответствующем значении pH. Профили ассоциации и диссоциации измеряли в реальном времени с помощью Octet RED96 (фирма FortéBio);

на фиг. 28 - представленные в примере 9 данные об уровнях ADA-ответа, измеренных с помощью ELISA, предназначенного для обнаружения мышиного IgG к лекарственному препарату (А; столбики представляют собой среднее значение  $\pm$  SD для группы обработки); и результаты корреляционного анализа (Б) между уровнями циркулирующего человеческого IgG, измеренными через 14 дней после i.v. инъекции (ось X), и ADA-сигналом присутствующим в этот же самый момент времени (ось Y). Для статистически значимых величин указан непараметрический коэффициент корреляции Спирмана;

на фиг. 29 - представленные в примере 10 данные об уровнях ADA-ответа после подкожной (s.c.) инъекции либо FluAB\_MLNS, либо FluAB\_wt. Данные представлены в виде ADA-сигнала (ОП при 450 нм), обнаруженного через 3 недели после s.c. инъекции в каждом индивидуальном образце сыворотки (n=5/группу), предварительно разведенном в ЗФР в соотношении 1:25 и затем подвергнутом 5-кратному серийному разведению.

### Примеры

Ниже представлены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления и аспекты изобретения. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления изобретения, представленными в настоящем описании. Описанные ниже процедуры и примеры приведены для более ясного понимания настоящего изобретения и осуществления его на практике специалистами в данной области. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается приведенными в качестве примера вариантами осуществления изобретения, которые следует рассматривать только в качестве иллюстраций отдельных аспектов изобретения и способов, которые являются функ-

ционально эквивалентными в рамках изобретения. Фактически на основе приведенного выше описания, прилагаемых чертежей и приведенных ниже примеров специалистам в данной области должны стать очевидными различные модификации помимо тех, которые представлены в настоящем описании. Все такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Безопасность и переносимость антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, для макак циномоглус.

Разрабатывали и получали антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее: (I) последовательности CDR, представленные в SEQ ID NO: 1-6, и (II) две мутации M428L и N434S в константных областях тяжелых цепей. Более конкретно, антитело содержит (I) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), представленную в SEQ ID NO: 8; и (II) две мутации M428L и N434S в константных областях тяжелых цепей. Еще более конкретно, антитело содержит тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. Указанное антитело обозначено в настоящем описании как "FluAB\_MLNS".

Для сравнения использовали антитело "FluAB\_wt", которое отличается от антитела "FluAB\_MLNS" только тем, что не содержит две мутации M428L и N434S в константных областях тяжелых цепей. Таким образом, применяемое для сравнения антитело "FluAB\_wt" содержит тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Вводили путем однократной внутривенной 60-минутной инфузии либо FluAB\_MLNS, либо FluAB\_wt в дозе 5 мг/кг в объеме 2,5 мл/кг, используя по три самки макак циномоглус (*Macaca fascicularis*) на тестируемую группу. Кровь или мочу для клинического химического и гематологического анализов собирали до введения дозы и в дни 7 и 21 после введения дозы.

После введения либо FluAB\_MLNS, либо FluAB\_wt в дозе 5 мг/кг путем 60-минутной внутривенной инфузии осуществляли тщательный мониторинг состояния здоровья и веса самок макак циномоглус и регулярно получали образцы крови и мочи. Никаких нежелательных явлений - отличных от гематомы через 24 ч и эритродермии через 3 дня после введения дозы в месте инокуляции у некоторых животных - не было обнаружено после внутривенной инокуляции антител. Все животные, как правило, были здоровы, у них обнаружено нормальное поглощение корма, и они в целом имели положительный прирост веса тела в течение эксперимента. Клинические химические, гематологические параметры и результаты анализа мочи оказались нормальными через 7 дней или 21 день после дозирования при сравнении с анализами образцов, полученных до введения дозы.

В целом, однократная внутривенная инфузия либо FluAB\_MLNS, либо FluAB\_wt макакам циномоглус не индуцировала нежелательных явлений и в целом хорошо переносилась.

Пример 2. Определение концентрации и фармакокинетических характеристик в плазме.

Целью представленных экспериментов было определение концентрации, установление времени полужизни и сравнение фармакокинетических параметров антитела FluAB\_MLNS, предлагаемого в настоящем изобретении, с соответствующими характеристиками применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt в плазме после однократной внутривенной инъекции.

Перед дозированием животных тестировали в отношении отсутствия у них (негативные животные) специфических для гриппа антител с использованием дот-иммуносорбции. Серопозитивных животных исключали из опыта, поскольку наличие ранее существующего иммунитета может влиять на результаты теста. Кроме того, исключали животных у которых развился ответ в виде антител к лекарственному препарату (ADA).

Вводили путем однократной 60-минутной внутривенной инфузии мг/кг либо FluAB\_MLNS, либо FluAB\_wt в дозе 5 в объеме 2,5 мл/кг, используя по три самки макак циномоглус на тестируемую группу. Кровь собирали в пробирки, содержащие до дозирования  $K_2EDTA$ , и обрабатывали для получения плазмы для тестирования фармакокинетики через примерно 1, 6, 24, 96, 168, 504, 840 и 1344 часа (ч) после введения дозы.

Концентрацию антител в плазме определяли *in vitro* с помощью ELISA-анализа. В целом, метод состоял в следующем: антиген IAV-НА (антиген белка гемагглютинина вируса гриппа А H1N1 A/California/07/2009 (с His-меткой); фирма Sino Biologicals) разводили до концентрации 2 мкг/мл в ЗФР и 25 мкл добавляли в лунки, расположенные на  $\frac{1}{2}$  площади плоскодонного 96-луночного планшета для ELISA, для сенсibilизации в течение ночи при 4°C. После сенсibilизации планшеты промывали дважды 0,5-кратным ЗФР, дополненным 0,05% Твин 20 (промывочный раствор), используя автоматическое промывочное устройство для ELISA. Затем планшеты блокировали, используя 100 мкл/лунку ЗФР, дополненного 1% БСА (блокирующий раствор), в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ), а затем промывали дважды. Образцы плазмы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4°C и затем разводили (в соотношении 1:10, а затем 1:30) до достижения конечного разведения 1:300 в блокирующем растворе в 96-луночных планшетах для культуры клеток. Тестированное минимальное разведение (1:300) плазмы макак, применявшееся для количественной оценки, гарантировало, что "эффект матрицы" был

незначительным. Затем образцы подвергали серийному разведению в соотношении 1:2 в трех повторностях для получения в целом 12 разведений. Аналогичным образом приготавливали стандарты для каждого подлежащего тестированию антитела посредством разведения антител в соотношении 1:300 до получения концентрации 1 мкг/мл в пуле предварительно инокулированной плазмы из всех тестируемых животных, имитируя матрицу тестируемых образцов. Затем стандарты подвергали серийному разведению в соотношении 1:3 в блокирующем растворе в трех повторностях для получения в целом 12 разведений. Добавляли 25 мкл полученных образцов или стандартов к сенсibilизированным гемагглютинином (НА) лункам и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После четырех промывок добавляли для детекции по 25 мкл на лунку козьего античеловеческого IgG, конъюгированного с HRP (AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fcy-фрагмент специфический; фирма Jackson ImmunoResearch), разведенного в блокирующем растворе в соотношении 1:5000 (конечная концентрация 0,16 мкг/мл), и инкубировали при КТ в течение 1 ч.

После четырех промывок планшеты проявляли, добавляя 40 мкл на лунку субстрата SureBlue TMB (фирма Biosconcept). После инкубации в течение ~7-20 мин при КТ, когда цветная реакция достигала плато (max ОП ~3,8), добавляли 40 мкл 1% HCl на лунку для прекращения реакции и измеряли абсорбцию при 450 нм с помощью спектрофотометра.

Для определения концентрации антител в плазме цинолмолгус строили график зависимости величин ОП, полученных на основе результатов ELISA, от концентрации с помощью программного обеспечения Gen5 (фирма BioTek). Применяли нелинейную подгонку кривой, используя модель с переменной крутизной наклона, четыре параметра и уравнение:  $Y=(A-D)/(1 + (X/C)^B) + D$ . Величины ОП разведений образцов, которые находились в предсказуемом диапазоне анализа стандартной кривой - по данным, полученным в установочном эксперименте с использованием образцов для контроля качества в верхнем, среднем или низком диапазоне кривой - интерполировали для количественной оценки образцов. Затем определяли концентрацию антител в плазме, учитывая конечное разведение образца. Если более одной величины разведения образца находилось в линейном диапазоне стандартной кривой, то использовали среднее значение этих величин. Фармакокинетические (ФК) данные анализировали с помощью WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (8.1.0.3530 Core Version, программное обеспечение Phoenix, фирма Certara) с использованием следующих установок: модель: данные для плазмы, введение путем постоянной инфузии; количество не отсутствующих данных: 8; интервал устойчивого состояния Таи: 1,00; время введения дозы: 0,00; уровень дозы: 5,00 мг/кг; продолжительность инфузии: 0,04 дня; метод расчета: линейный метод трапеций с линейной интерполяцией; взвешивание для расчетов лямбда\_z: однородное взвешивание; метод лямбда\_z: поиск наилучшего подбора для лямбда\_z, логарифмическая регрессия. Построение графиков и статистические анализы (линейная регрессия или анализ выбросов) осуществляли с помощью программного обеспечения Prism 7.0 (фирма GraphPad, Ла-Холья, шт. Калифорния, США). Анализ выбросов осуществляли, используя метод ROUT (Q=1%), который позволяет находить любое количество выбросов в любом направлении.

Результаты представлены на фиг. 1. Анализ образцов плазмы цинолмолгус, отобранных вплоть до дня 56 после инокуляции, продемонстрировал, что предлагаемое в настоящем изобретении антитело FluAB\_MLNS имело удлиненное время полужизни *in vivo* относительно применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt (фиг. 1). С помощью некомпартментального анализа с использованием WinNonLin установлено, что T<sub>1/2</sub> составляло 19,5 дня для предлагаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS, в то время как T<sub>1/2</sub> составляло 11,6 дня для применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt. Нижний предел количественной оценки составлял 300 нг/мл.

В целом, предлагаемое в настоящем изобретении антитело FluAB\_MLNS имело удлиненное время полужизни *in vivo* относительно применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt по меньшей мере вплоть до дня 56 после инокуляции.

Пример 3. Продолжительная стабильность *in vivo*.

Для оценки *in vivo* стабильности и функциональной способности в отношении связывания с антигеном предлагаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS в течение времени фармакокинетические измерения (описанные в примере 2) в группе, которой вводили предлагаемое в настоящем изобретении антитело FluAB\_MLNS, продлевали до дней 86 и 113 после инокуляции. В дни 1, 21, 56, 86, 113 после инокуляции количественно оценивали функциональную способность FluAB\_MLNS с использованием метода ELISA для определения связывания с гемагглютинином (НА), который описан в примере 2.

Кроме того, определяли общее количество человеческих антител в плазме макак с помощью специфического анти-CH2 ELISA, используя в качестве иммобилизованного МАт антитело, которое специфически связывается с CH2-областью человеческих Ат, но не с Ат обезьян. Для измерения общего человеческого IgG и, следовательно, количества всех инокулированных человеческих антител в плазме цинолмолгус, применяли ELISA с захватом с помощью мышинового антитела к CH2-домену, специфического для человеческого IgG (клон R10Z8E9; фирма Thermo Scientific). Было подтверждено, что это МАт не дает перекрестную реакцию с IgG обезьян. Для сенсibilизации в лунки, расположенные на 1/2 площади плоскодонного 96-луночного планшета для ELISA, добавляли мышинный античеловеческий IgG-CH2 в ЗФР в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшеты промывали и добавляли 100 мкл/лунку блокирующего раствора с 5% БСА в течение 1 ч при КТ. Стандарты предла-

гаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS приготавливали путем разведения FluAB\_MLNS до концентрации 1 нг/мл в блокирующем растворе. Затем стандарты серийно разводили с дублированием в соотношении 1:1,5 в блокирующем растворе с получением в целом 12 разведений. Образцы плазмы циномоглус центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4°C и серийно разводили до конечного разведения 1:1000, 1:5000 или 1:15000 в блокирующем растворе. После промывки планшета 25 мкл образцов или стандартов добавляли в планшеты для ELISA и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После трех промывок добавляли для детекции по 25 мкл козьего античеловеческого IgG, конъюгированного с HRP (AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fcγ-фрагмент специфический; фирма Jackson ImmunoResearch), разведенного в блокирующем растворе с 1% БСА, и инкубировали при КТ в течение 45 мин. После трех промывок планшеты проявляли, добавляя 40 мкл на лунку субстрата SureBlue TMB (фирма Bioscript). После инкубации в течение 20 мин при КТ добавляли 40 мкл 1% HCl для прекращения реакции и измеряли абсорбцию при 450 нм.

Результаты представлены на фиг. 2. Оба метода количественной оценки приводили к получению сходных результатов, касающихся концентрации антител в плазме циномоглус (фиг. 2). Дополнительный анализ на основе линейной регрессии продемонстрировал, что зависимость между количественной оценкой на основе НА-связывания и оценкой общего количества антител к CH2 соответствует линейной схеме для всех четырех выбранных моментов времени. Таким образом, общее количество FluAB\_MLNS, присутствующее в плазме, обладало функциональностью в отношении связывания со стволовой областью гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А (IAV) также и после анализа через 86 и 113 дней *in vivo*.

В целом, при осуществлении удлиненного эксперимента для предлагаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS продемонстрировано наличие функционального связывания антитела и в результате хорошей продолжительной стабильности *in vivo* вплоть до 113 дней после инокуляции.

Пример 4. Концентрация антител в мазках из носа и биораспределение.

Для изучения биораспределения предлагаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS и применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt между слизистой носа и плазмой определяли концентрацию антитела в мазках из носа. Для этой цели мазки из носа макак, которых использовали в опытах, описанных в примере 2, собирали через 24, 504 и 1344 ч после введения предлагаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS или применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt. Концентрации антител FluAB\_MLNS и FluAB\_wt в мазках из носа определяли в целом согласно методу, описанному в примере 2 для определения концентраций в плазме, со следующими небольшими адаптациями: (а) планшеты для ELISA блокировали в течение 2 ч при КТ; (б) образцы мазков из носа разводили, начиная с соотношения 1:2, используя 1% БСА в ЗФР, а затем подвергали серийному разведению в соотношении 1:2 для получения в целом 8 разведений; (в) в качестве контроля "эффекта матрицы" применяли среду для мазка из носа (RT MINI Viral Transport Medium; фирма Coran).

Для элиминации различий при осуществлении процедуры получения мазков или в количестве выделений из носа у каждого животного и в различные моменты времени (дни 1, 21 и 56) результаты, полученные с использованием мазков из носа, стандартизовали относительно содержания мочевины. Мочевина свободно диффундирует в крови, присутствуя в сходных количествах в указанных образцах плазмы или мазков (Lim и др., Antimicrob Agents Chemother 61(8), 2017, e00279-17). Для этой цели осуществляли количественное измерение азота мочевины (BUN, азот мочевины крови), используя набор для колориметрического измерения азота мочевины ("Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit") (фирма Invitrogen), согласно процедуре производителя. В целом, метод состоял в следующем: образцы разводили в соотношении 1:3 в ЗФР и смешивали с реагентами А и В из набора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Окрашенный продукт окислительно-восстановительной реакции выявляли при 450 нм, используя ридер для 96-луночных микропланшетов. Количественную оценку осуществляли посредством сравнения образцов со стандартами BUN, которые находились в наборе и которые обрабатывали аналогичным образом.

Результаты представлены на фиг. 3. Стандартизованное количество антител в мазках из носа снижалось с течением времени (фиг. 3А). Оценка биораспределения путем сравнения концентраций в носу относительно плазмы продемонстрировала отсутствие различий между предлагаемым в настоящем изобретении антителом FluAB\_MLNS и применяемым для сравнения антителом FluAB\_wt (фиг. 3Б), это позволяет предположить, что мутация MLNS-Fc хотя и пролонгировала время полужизни FluAB\_MLNS в плазме, но не приводила к повышению биораспределения антитела, находящегося в слизистой носа.

В целом, для трех вариантов МАт не выявлено никаких существенных различий в биораспределении между слизистой носа и плазмой.

Пример 5. Профилактическая активность антитела FluAB\_MLNS, оцененная на инфицированных PR8 Tg32-мышях.

Далее изучали профилактическую активность предлагаемого в настоящем изобретении антитела FluAB\_MLNS в сравнении с антителом FluAB\_wt с использованием мышинной модели летальной инфекции гриппа H1N1.

Для изучения профилактической эффективности 9-14-недельным FcRn-/hFcRn мышам линии 32Tg (фон C57B6) инъецировали внутривенно (*i.v.*) (через хвостовую вену) 5 мл/кг раствора, содержащего

предлагаемое в настоящем изобретении антитело FluAB\_MLNS или применяемое для сравнения антитело FluAB\_wt, используя диапазон доз от 0,3 до 1 мг/кг. Через 24 ч после i.v.-инъекции у мышей отбирали образцы крови из хвостовой вены для определения уровней антител в сыворотке до инъекции. Отбор образцов крови повторяли также в дни 6 и 13 после инъекции (p.i.). Как инъецированных антителом, так и необработанных мышей анестезировали (изофлуран, 4% в O<sub>2</sub>, 0,3 л/мин) и осуществляли контрольное заражение интраназально (i.n.) путем медленного закапывания в обе ноздри 50 мкл (25 мкл/в каждую) ЗФР, содержащего 5 летальных для 50% мышей доз (5 MLD<sub>50</sub>, что эквивалентно 1200 TCID<sub>50</sub>/мышь) вируса гриппа А (H1N1, A/Puerto Rico/8/34, согласно методу, описанному у Cottey R., Rowe C.A. и Bender, B.S. Influenza virus. Curr Protoc Immunol Chapter 19, Unit 19.11-19.11.32, 2001). Каждую мышь в течение примерно 1 мин держали вертикально, слегка откинув голову назад, для снижения вероятности вытекания инокулята из ноздрей. После завершения процедуры и появления рефлекса выпрямления животных возвращали в клетку. Ежедневно осуществляли мониторинг снижения веса и симптомов болезни у мышей вплоть до дня 14 p.i. и осуществляли их умерщвление, если снижение составляло более 20% от их первоначального веса тела (где за 0% принимали день заражения) или достигался показатель заболеваемости, составляющий 4 балла. В табл. 1 представлены детали определения показателя заболеваемости.

Таблица 1

Показатель заболеваемости инфицированных PR8 мышей

Показатель заболеваемости (балл)	Клинические признаки
1	Здоровые
2	Постоянно взъерошенная шерсть на шее
3	Пилоэрекция, возможно более глубокое дыхание, снижение бдительности
4	Затрудненное дыхание, тремор и заторможенность
5	Нарушенная походка, пониженная подвижность, истощение, цианоз хвостушей
6	Смерть

В конце эксперимента всех животных умерщвляли для сбора сыворотки и легких.

Получение сыворотки:

Собирали примерно 0,05 мл крови в содержащие гель пробирки и выдерживали 30 мин при КТ. Пробирки центрифугировали в течение 5 мин при t 5500 об/мин (3200 × g), сыворотку переносили в новые пробирки и хранили при -20°C до применения.

Осуществляли два независимых эксперимента согласно следующим протоколам.

Таблица 2

Протокол исследования в эксперименте 1

Группа	Кол-во животных	IV-обработка	Доза МАт
1	4	-	-
2	8	FluAB_wt	1 мг/кг
3	4	FluAB_wt	0,3 мг/кг
4	8	FluAB_MLNS	1 мг/кг
5	4	FluAB_MLNS	0,3 мг/кг

Таблица 3

Протокол исследования в эксперименте 2

Группа	Кол-во животных	IV-обработка	Доза МАт
1	9	-	-
2	10	FluAB_wt	0,3 мг/кг
3	6	FluAB_MLNS	0,3 мг/кг

Количественное определение с помощью ELISA циркулирующих МАт.

Уровни циркулирующих антител в сыворотке оценивали в дни 0 и 6. В целом, метод состоял в следующем: половину площади планшетов для ELISA сенсibilизировали в течение ночи при 4°C рекомбинантным гемагглютинином (НА) из H1N1-штамма A/California/07/09 (2 мкг/мл, в ЗФР, 25 мкл/лунку). После блокады (ЗФР/1% БСА, 100 мкл/лунку, 1 ч при КТ) и двух промывок (220 мкл/лунку) промывочным раствором для ELISA (ЗФРТ), добавляли с дублированием оба разведения сыворотки (начальное разведение 1:150 для дозы 1 мг/кг, 1:50 для дозы 0,3 мг/кг) и стандарты антител (FluAB\_MLNS и FluAB\_wt, 0,1 мкг/мл) (25 мкл/лунку) и осуществляли серийные разведения (1:2 с получением 10 разведений сыворотки, 1:3 с получением 8 разведений стандартных антител). После инкубации в течение 1,5 ч при КТ планшеты промывали 4 раза ЗФРТ и дополнительно инкубировали в течение 1,5 ч при КТ с меченым НRP вторичным античеловеческим антителом (0,16 мкг/мл, 25 мкл/лунку). После 4 промывок с помощью ЗФРТ в планшеты распределяли раствор субстрата (25 мкл/лунку), давали пройти реакции в течение 14 мин и блокировали с помощью 1% HCl (об./об., 25 мкл/лунку). Планшеты окончательно считывали.

вали при 450 нм с помощью спектрофотометра для количественной оценки сигнала. Уровни концентраций рассчитывали с помощью модели нелинейной регрессии (модель с переменной крутизной наклона, четыре параметра, фирма GraphPad Prism) log-зависимость (агонист) от ответа.

Анализ данных.

Данные представляли в виде графика и анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, версия 8.0 для Macintosh, GraphPad Software, Ла-Холья, шт. Калифорния, США), [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Непрерывные переменные оценивали для определения статистически значимого различия ( $p < 0,05$ , 95%-ный доверительный интервал), используя общепринятый 2-сторонний дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Данные о выживаемости сравнивали с использованием логрангового анализа методом Мантеля-Кокса (величина  $p < 0,05$  рассматривалась в качестве критерия статистической значимости). Объединяли данные двух независимых экспериментов, описанных выше.

Результаты.

Профилактическую активность оценивали после i.v.-введения FluAB\_MLNS и FluAB\_MLNS (1 и 0,3 мг/кг) мышам линии Tg32 за один день до контрольного заражения вирусом H1N1 PR8 посредством внутриназального заражения. Результаты представлены на фиг. 4-6.

Как продемонстрировано на фиг. 4, у мышей, обработанных FluAB\_MLNS в дозе либо 1 мг/кг (панель Г), либо 0,3 мг/кг (панель Д), обнаружена меньшая потеря веса по сравнению с необработанными мышами (панель А) и мышами, которым инъецировали FluAB\_wt (панели Б и В).

Более высокое защитное действие FluAB\_MLNS по сравнению с FluAB\_wt подтверждено при анализе выживаемости, данные о которой представлены на фиг. 5.

Различия в эффективности между FluAB\_MLNS и FluAB\_wt не коррелировали с различными уровнями циркулирующих антител в сыворотке, измеренными через 1 и 7 дней после i.v.-введения антител (фиг. 6). Следует отметить, что через 14 дней после инъекции отсутствовали поддающиеся измерению уровни циркулирующих антител (данные не представлены).

В целом, для FluAB\_MLNS на мышах линии Tg32 продемонстрировано более высокое защитное действие в отношении H1N1 PR8 после интраназального контрольного заражения вирусом относительно применяемого для сравнения антитела FluAB\_wt. Эффективность не зависела от уровней циркулирующих антител. Эти данные позволяют предположить, что повышенное взаимодействие FluAB\_MLNS с hFcRn, который экспрессируется мышами линии Tg32, опосредует также действия *in vivo*, не связанные с удлинением временем полужизни антитела, такие как повышенная эффективность с точки зрения защитной активности.

Пример 6. Комбинация антитела FluAB\_MLNS с различными противовирусными препаратами.

Комбинации лекарственных средств обеспечивают выраженную возможность повышения эффективности при снижении вероятности развития устойчивости. Кроме того, возможное аддитивное или синергетическое действие может в результате обеспечивать подход щадящего дозирования. Лекарственные средства против гриппа, одобренные в настоящее время FDA, включают ингибиторы нейраминидазы осельтамивир и занамивир, а также одобренный в последнее время балоксавир марбоксил, который принадлежит к классу ингибиторов эндонуклеазы.

Для оценки совместной активности предлагаемого в изобретении антитела FluAB\_MLNS с противовирусными препаратами осельтамивир, занамивир или балоксавир марбоксил в отношении обоих репрезентивных вирусных штаммов H1N1 и H3N2 осуществляли анализ нейтрализации *in vitro* для изучения достигнутого в результате ингибирующего действия. Анализ совместного действия осуществляли с использованием графика медианного эффекта и расчета комбинационного индекса (коэффициент синергизма) (CI).

В целом, метод состоял в следующем: клетки MDCK (клетки почки кокер-спаниеля) высевали и расчета 30000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты (круглодонные, черные). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Через 24 ч приготавливали 4-кратные разведения антитела и противовирусных препаратов (осельтамивир, занамивир или балоксавир марбоксил) в 60 мкл среды для заражения (среда MEM (фирма Sigma Aldrich, каталожный № M0644) + Glutamax (фирма Invitrogen, 41090-028) + 1 мкг/мл обработанного TPCK (тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон) трипсина (фирма Worthington Biochemical, № LS003750) + 10 мкг/мл канамицина), используя перекрестные серийные разведения 1:2 FluAB\_MLNS (начиная с концентрации 166,7 нМ, до получения в коечном итоге 9 горизонтальных точек) и различных противовирусных препаратов (осельтамивир, занамивир или балоксавир марбоксил), начиная с концентрации 125 нМ (250 нМ для занамивира), 7 вертикальных точек), согласно схеме планшета, представленного на фиг. 7.

Для каждой комбинации приготавливали три независимых планшета для создания трех повторностей для каждого соотношения комбинации лекарственное средство - лекарственное средство. Для каждого соединения в каждый планшет включали полученные в результате титрования образцы (а именно, по 9 точек для FluAB\_MLNS и 8 точек для каждого противовирусного препарата). Раствор вируса приготавливали в концентрациях, соответствующих 120×TCID<sub>50</sub>, в 60 мкл, далее разводили либо в соотношении 1:1 в MEM, либо смешивали в соотношении 1:1 с разведениями FluAB\_MLNS и инкубировали в течение

1 ч при 33°C. Клетки промывали 2 раза, используя 200 мкл/лунку MEM без добавок с последующим добавлением либо 100 мкл только вируса, либо 100 мкл смеси FluAB\_MLNS/вирус (100×TCID<sub>50</sub>/лунку), и инкубировали в течение 4 ч при 33°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После добавления 100 мкл/лунку среды для заражения клетки дополнительно инкубировали в течение 72 ч при 33°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. В день 3 после заражения приготавливали 20мкМ раствор гидрата натриевой соли MuNANA (4-MUNANA (2-(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты) (фирма Sigma-Aldrich), № 69587) в MuNANA-буфере (MES 32,5 мМ/CaCl<sub>2</sub> 4мМ, pH 6,5) и вносили из расчета 50 мкл/лунку в черные 96-луночные планшеты. Переносили в планшеты по 50 мкл титрованного супернатанта, содержащего либо нейтрализующий агент, либо только вирус, и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Затем реакцию прекращали, добавляя 100 мкл/лунку 0,2 М глицина/50% EtOH, pH 10,7. Флуоресценцию оценивали количественно при 460 нм с помощью флуориметра (фирма Bio-Tek).

Относительный уровень нейтрализации вирусов рассчитывали по формуле

$$1 - \left( \frac{f_x - f_{min}}{f_{max}} \right),$$

где  $f_x$  обозначает флуоресцентный сигнал образца (клетки + вирус + FluAB\_MLNS + противовирусный препарат);  $f_{min}$  обозначает минимальный флуоресцентный сигнал (только клетки без вируса);  $f_{max}$  обозначает максимальный флуоресцентный сигнал (клетки + только вирус).

Данные об относительном уровне нейтрализации использовали для осуществления количественного анализа зависимости доза-эффект для комбинаций лекарственных средств - лекарственное средство согласно методу Chou и Talalay (Chou T.C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 1984, с. 27-55). Комбинационный индекс, пораженную фракцию (Fa) и изоболограммы получали с помощью программного обеспечения CompuSyn (фирма ComboSyn Inc., Paramus, шт. Нью-Джерси, США) (Chou T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews* 58, 2006, с. 621-681).

Результаты представлены на фиг. 8-26 и описаны ниже.

Комбинация FluAB\_MLNS и осельтамивира.

Относительную эффективность FluAB\_MLNS и осельтамивира в отношении нейтрализации вирусов гриппа А сравнивали *in vitro* с использованием двух вирусных серотипов, репрезентативных для обоих штаммов H3N2 и H1N1. Как продемонстрировано на фиг. 8, оба соединения при их индивидуальном тестировании обладали одинаковой зависящей от дозы способностью полностью ингибировать заражение клеток, обработанных независимо либо вирусом H3N3, либо вирусом H1N1 (фиг. 8А, Б). Установлено, что величины IC<sub>50</sub>, рассчитанные из графика медианного эффекта (фиг. 8В, Г) после логлинеаризации (согласно методу, описанному у Chou T.C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 1984, с. 27-55), находились в наномолярном диапазоне как для FluAB\_MLNS (17,9 и 15,6 нМ для штаммов H3 и H1 соответственно), так и для осельтамивира (7 и 9,1 нМ для штаммов H3 и H1 соответственно). В целом, не обнаружено существенных различий касательно ингибирующего ответа на FluAB\_MLNS инфекции, вызываемой вирусами H3 и H1, в то время как вирус H1N1 оказался несколько более чувствительным к ингибирующему действию осельтамивира.

Для тестирования воздействия комбинации FluAB\_MLNS и осельтамивира на нейтрализацию заражения MDCK-клеток вирусами H3 и H1 оба соединения серийно разводили в указанных выше различных соотношениях и оценивали ферментативную активность нейраминидазы (NA; в качестве показателя содержания вируса в культуре) в присутствии различных концентраций лекарственного средства и сравнивали воздействия индивидуального лекарственного средства. Нейтрализующее действие, измеренное в присутствии FluAB\_MLNS, существенно повышалось в случае одновременного присутствия гетеромолярных концентраций второго соединения, что позволяет предположить наличие синергетического, а не просто аддитивного, действия, в отношении инфекции, вызываемой обоими штаммами H3 и H1 вирусов (фиг. 9). Обнаружено небольшое различие в чувствительности вирусов H1 и H3 к ингибирующему действию осельтамивира.

Для точного количественного определения предполагаемого синергетического действия различных соотношений в комбинации лекарственных средств данные о нейтрализации дополнительно преобразовывали на основе принципа медианного эффекта и анализировали с помощью программного обеспечения CompuSyn, как описано выше. На фиг. 10 представлен график медианного эффекта, характеризующий зависимость воздействий нескольких различных постоянных соотношений комбинации FluAB\_MLNS-осельтамивир.

В программном обеспечении CompuSyn используется логарифмическое преобразование уравнения медианного эффекта для экспериментальных данных и ее применяют для расчета и эффективности (IC<sub>50</sub>), и так называемого комбинационного индекса (CI) различных комбинаций лекарственных средств. CI представляет собой полученный из уравнения Chou-Talalay (медианный эффект) параметр, который учитывает физико-химические свойства согласно закону действующих масс и определяется суммой двух

соотношений между долей дозы лекарственного средства 1, объединенной с лекарственным средством 2, необходимой для достижения определенного действия, деленной на дозу лекарственных средств 1 и 2 при их индивидуальном применении, необходимой для получения такого же действия. Согласно этому математическому алгоритму  $CI = 1$  соответствует аддитивному действию,  $CI < 1$  соответствует синергизму, а  $CI > 1$  соответствует антагонизму.

Как продемонстрировано на фиг. 11 и 12, для всех протестированных соотношений комбинаций и для обоих вирусов H1 (фиг. 11) и H3 (фиг. 12), предсказанные величины  $CI$  в пределах всего диапазона ингибированной фракции описывались кривой, лежащей значительно ниже 1, для всех соотношений комбинаций лекарственных средств, и фактические экспериментальные точки различных объединенных концентраций также находились в диапазоне ниже 1 практически для всех комбинаций. В совокупности эти данные свидетельствуют о выраженном синергетическом действии FluAB\_MLNS и осельтамивира при их объединении.

В альтернативном подходе указанные данные можно описывать с помощью диаграмм изобол (изоболограмм), которые позволяют сравнивать эквипотентные концентрации как индивидуальных, так и применяемых в комбинации лекарственных средств. Как продемонстрировано на фиг. 13 и 14, распределение величин  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  для трех различных соотношений комбинаций находилось значительно ниже линий изобол, соединяющих соответствующие величины  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  для протестированных индивидуально лекарственных средств как в случае H1 (фиг. 13), так и в случае H3 (фиг. 14), что свидетельствует об устойчивом синергизме (в то время как аддитивное действие и антагонизм должны описываться эквипотентными точками, локализованными либо на, либо выше изоболы для индивидуального лекарственного средства соответственно).

Комбинация FluAB\_MLNS и занамивира.

Относительную эффективность FluAB\_MLNS и занамивира в отношении нейтрализации вирусов гриппа А также сравнивали *in vitro* на двух вирусных серотипах, репрезентативных для обоих штаммов H3N2 и H1N1. Как продемонстрировано на фиг. 15, оба соединения при их индивидуальном тестировании обладали зависящей от дозы способностью полностью ингибировать заражение клеток, обработанных независимо либо вирусом H3N3, либо вирусом H1N1. Относительные рассчитанные величины  $IC_{50}$  составляли 23,1-24,4 нМ для FluAB\_MLNS и 10,7-13,7 нМ для занамивира.

Касательного совместного действия FluAB\_MLNS и занамивира на фиг. 16 продемонстрировано, что аналогично осельтамивиру, занамивир значительно повышал ингибирующую способность FluAB\_MLNS в отношении обоих вирусов H1 и H3.

Количественную оценку синергетического действия также осуществляли с помощью CompuSyn и описанного выше принципа медианного эффекта. На фиг. 17 представлены графики медианного эффекта, характеризующие зависимость воздействий FluAB\_MLNS и занамивира. Рассчитанные величины  $CI$  для FluAB\_MLNS и занамивира представлены на фиг. 18 и 19, и они четко демонстрируют синергетическое действие обоих лекарственных средств как в отношении вируса H1 (фиг. 18), так и вируса H3 (фиг. 19), о чем свидетельствует то, что величины составляют менее 1 для всех протестированных экспериментальных точек. В соответствии с этим, касательно обоих штаммов вирусов изоболограммы свидетельствуют о сильном синергетическом действии на уровне величин  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  (что продемонстрировано на фиг. 20 и 21), которые все оказались существенно ниже величин  $IC$  для лекарственного средства при его индивидуальном применении.

Комбинация FluAB\_MLNS и балоксавира марбоксила.

Одобренный в последние годы ингибитор эндонуклеазы балоксавир марбоксил первоначально сравнивали с FluAB\_MLNS индивидуально на обоих штаммах H1 and H3 аналогично методу, описанному выше для осельтамивира и занамивира. Результаты представлены на фиг. 22. Относительные рассчитанные величины  $IC_{50}$  составляли 20,1-15,4 нМ для FluAB\_MLNS и 4,9-2,3 нМ для балоксавира марбоксила.

Хотя балоксавир обладает другим механизмом действия в отношении ингибирования репликации вируса по сравнению с ингибиторами NA, лекарственное средство все еще обладало способностью значительно повышать ингибирующую активность FluAB\_MLNS, с четко выраженным синергетическим действием (фиг. 23). Данные об ингибировании, полученные с использованием различных соотношений в комбинации, применяли для расчета и построения графика медианного эффекта с помощью программного обеспечения CompuSyn, и определяли тип взаимодействия лекарственное средство - лекарственное средство согласно описанному выше методу (фиг. 24). Рассчитанные величины  $CI$  для FluAB\_MLNS и балоксавира марбоксила (фиг. 25) четко демонстрируют наличие синергетического действия между двумя лекарственными средствами в отношении обоих вирусов H1 и H3, о чем свидетельствует то, что величины составляют менее 1 для большей части протестированных экспериментальных точек. Изоболограммы свидетельствуют о сильном и полном синергетическом действии, установленным на уровне величин  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  и  $IC_{90}$  (фиг. 26).

В целом, установлено, что нейтрализующая активность FluAB\_MLNS в отношении обоих штаммов H1 и H3 синергетически повышалась при использовании различных противовирусных препаратов, а именно: ингибиторов NA осельтамивира и занамивира, а также ингибитора эндонуклеазы балоксавира марбокси-

ла.

Пример 7. Связывание с человеческим FcRn при различных pH.

С помощью бислойной интерферометрии (BLI) проводили параллельное сравнение способности FluAB\_wt и FluAB\_MLNS к связыванию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

Для этой цели связывание FluAB\_wt и FluAB\_MLNS с человеческим FcRn измеряли с помощью устройства Octet RED96 (бислойная интерферометрия BLI, фирма ForteBio). Биосенсоры, сенсибилизированные антителом к человеческому Fab-СН1, предварительно гидрировали в кинетическом буфере в течение 10 мин при КТ. Затем человеческое МАт (FluAB\_wt или FluAB\_MLNS) наносили на биосенсоры в концентрации 1 мкг/мл в кинетическом буфере при pH 7,4 в течение 30 мин. Исходный уровень измеряли в кинетическом буфере (стерильный профильтрованный 0,01% свободный от эндотоксинов сывороточный альбумин, 0,002% Твин-20 (Полисорбат 20), 0,005% NaN<sub>3</sub> в ЗФР) при pH 7,4 или pH 6, в течение 4 мин. Затем загруженные человеческим Ат сенсоры в течение 7 мин подвергали воздействию раствора человеческого FcRn в концентрации 1 мкг/мл в кинетическом буфере при pH 7,4 или pH 6,0 для измерения ассоциации FcRn-МАт в различном окружении (on-rate, скорость реакции ассоциации). Затем определяли диссоциацию в кинетическом буфере при таком же значении pH в течение еще 5 мин (off-rate, скорость реакции диссоциации). Все стадии осуществляли при перемешивании при 1000 об/мин при 30°C. Профили ассоциации и диссоциации определяли в реальном времени по изменению картин интерференции.

Как продемонстрировано на фиг. 27, антитело FluAB\_MLNS связывалось с человеческим FcRn с более высокой аффинностью по сравнению с FluAB\_wt при кислом pH (pH 6,0), в то время как ни FluAB\_MLNS, ни FluAB\_wt не связывались с FcRn при нейтральном pH (pH 7,4).

Пример 8. Характеризация полиморфизмов, идентифицированных в удлинённом эпитопе антитела.

Исторические полиморфизмы в удлинённом эпитопе изучали в отношении их воздействия на нейтрализующую активность FluAB\_MLNS с использованием вирусов, созданных с помощью реверсивной генетики с использованием H1 HA или H3 HA с (генетическим) фоном A/Puerto Rico/8/34 (PR8).

Однонуклеотидные полиморфизмы интродуцировали в плазмиды PR8 H1 HA или A/Aichi/2/68 (Aichi) HA pHW2000 с помощью сайтнаправленного мутагенеза. Сохраняли рекомбинантный вирус гриппа А в ассоциации с H1 или H3 HA на PR8-фоне с использованием стандартных методов (например, описанных у Erich Hoffmann, Gabriele Neumann, Yoshihiro Kawaoka, Gerd Hobom, Robert G. Webster, A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (11), май 200 г., с. 6108-6113; doi: 10.1073/pnas.100133697).

Нейтрализующую активность оценивали на MDCK-клетках с использованием стандартных методов. Например, нейтрализующую активность можно оценивали на MDCK-клетках, например, в 96-луночных планшетах. Для этой цели MDCK-клетки высевали из расчета 30000 клеток/лунку за 24 ч до заражения. Антитело FluAB\_MLNS можно инкубировать с вирусом в течение 1 ч при 37°C перед добавлением к MDCK-клеткам. Для этого можно создавать 9 серийных разведений в соотношении 1:2,5 FluAB\_MLNS в среде для заражения и каждое разведение можно тестировать в трех повторностях (например, 50 мкг/мл - конечная концентрация 0,03 мкг/мл) и можно инкубировать с 120 TCID<sub>50</sub> вируса в течение 1 ч при 37°C. MDCK-клетки можно промывать дважды с помощью ЗФР, можно добавлять 100 мкл/лунку раствора вирус:антитело и клетки можно инкубировать в течение 4 ч при 37°C. Через 4 ч к клеткам можно добавлять 100 мкл/лунку среды для заражения. После инкубации в течение 72 ч при 37°C, вирусную РНК можно экстрагировать и измерять с помощью qOT-ПЦР, например, используя WHO-праймеры (World Health Organization. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A H1N1. 28 апреля 2009 г.). Величина IC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию антитела в мкг/мл, при которой репликация вирусов снижается на 50%, и ее можно рассчитывать с помощью аппроксимации данных, стандартизованных относительно результатов, полученных в контрольных лунках (не содержащих вирус и содержащих только вирус), нелинейной 4-параметрической логистической кривой.

Данные о нейтрализующей активности FluAB\_MLNS в отношении полиморфизмов H1 и H3 HA в удлинённом эпитопе представлены ниже в табл. 4.

Таблица 4

Вирус	Аминокислотные изменения в HA	FluAB_MLNS	
		Геометр. среднее характеризующей нейтрализацию IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Кратность изменения относительно WT-вируса
PR8:Aichi HA wt	Дикий тип	5,6	NA
PR8:Aichi HA P11S	P11S	9,5	1,7
PR8:Aichi HA D46N	D46N	3,3	0,6
PR8:Aichi HA N49T	N49T	5,0	0,9
PR8 wt	Дикий тип	4,7	NA
PR8 HA N146D	N146D	5,5	1,2

Aichi обозначает A/Aichi/2/68; геометр. среднее обозначает геометрическое среднее;

HA обозначает гемагглютинин;

NA обозначает непригодно;

PR8 обозначает A/Puerto Rico/8/34 H1N1;

wt обозначает дикий тип.

Касательно вирусов, кодирующих H3 HA, установлено, что антитело FluAB\_MLNS нейтрализовало вирусы с мутациями HA1 P11S, HA2 D46N или HA2 N49T, что характеризовалось величинами IC<sub>50</sub>, сходными с аналогичными величинами для вируса дикого типа (изменение IC<sub>50</sub> < 2-кратного относительно вируса дикого типа). Касательно вирусов, кодирующих H1 HA, установлено, что FluAB\_MLNS нейтрализовало вирусы, кодирующие HA2 N146D, что характеризовалось величинами IC<sub>50</sub>, сходными с аналогичными величинами для вируса дикого типа (изменение IC<sub>50</sub> < 2-кратного относительно вируса дикого типа). Кроме того, применяемый штамм дикого типа PR8 кодировал полиморфизмы L38Q и D46N HA2 и его нейтрализация антителом FluAB\_MLNS характеризовалась величиной IC<sub>50</sub>, составляющей 4,7 мкг/мл. В целом установлено, что в случае FluAB\_MLNS все изученные полиморфизмы приводили к кратности изменения IC<sub>50</sub> < 2 по сравнению с вирусом дикого типа. В целом, антитело FluAB\_MLNS эффективно нейтрализовало все изученные исторические полиморфизмы в удлиненном эпизоде (H3 HA: HA1 P11S, HA2 D46N или HA2 N49T; H1 HA: N146D).

Пример 9. Ответ в виде антитела к лекарственному препарату у Tg32-мышей.

Касательно мутации M428L/N434S в настоящее время считается, что эта мутация повышает иммуногенность антител, которые содержат указанную мутацию (Brian C. Mackness, Julie A. Jaworski, Ekaterina Boudanova, Anna Park, Delphine Valente, Christine Mauriac, Olivier Pasquier, Thorsten Schmidt, Mostafa Kabiri, Abdullah Kandira, Katarina Radošević и Huawei Qiu. Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life, mAbs, 11:7, 2019, с. 1276-1288; Maeda A., Iwayanagi Y., Naraya K. и др. Identification of human IgG1 variant with enhanced FcRn binding and without increased binding to rheumatoid factor autoantibody. MAbs 9(5), 2017, с. 844-853).

Для оценки иммуногенности, в частности ответа против лекарственного препарата (антитела к лекарственному препарату; ADA), антитела FluAB\_MLNS в сравнении с родительским антителом FluAB\_wt, двум различным группам (n=5) TG32-мышей (мыши, трансгенные по человеческому FcRn) инъецировали i.v. моноклональные антитела либо FluAB-MLNS, либо FluAB\_wt в дозе 5 мг/кг. Затем для оценки циркулирующих уровней инъецированных МАТ получали образцы крови в различные моменты времени. Образцы, отобранные в дни 14 и 21 после инъекции, использовали для оценки с помощью специфического ELISA ответа в виде антител к лекарственному препарату (ADA), вызываемого инъецированными человеческими моноклональными антителами.

В целом, метод состоял в следующем: очищенными моноклональными антителами FluAB\_wt и FluAB\_MLNS в концентрации 2 мкг/мл сенсibilizировали 96-луночные планшеты. После блокады сыворотку из обработанных животных, полученную через 14 дней и 21 день, разведенную в соотношении 1:180, инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре (КТ). После промывок в планшеты добавляли меченный пероксидазой F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент козьего антимишиного IgG (0,16 мкг/мл) и инкубировали в течение 1,5 ч при КТ. Затем выявляли ADA IgG (мышинные антитела против инъецированных антител FluAB\_wt и FluAB\_MLNS) с использованием соответствующего субстрата и результаты считывали с помощью спектрофотометра. Данные представлены в виде значений ОП (450 нм), полученных в каждом индивидуальном образце сыворотки (n=5/группу), собранном через 14 дней и 21 день после i.v.-введения антитела. Сыворотку из наивных Tg32-мышей (ctrl) применяли в качестве отрицательного контроля.

Результаты представлены на фиг. 28. При создании изобретения неожиданно было установлено, что сигнал, соответствующий мышиному сывороточному IgG, дающему реакцию с антителом FluAB-MLNS, оказался очень низким и соответствовал сигналу, обнаруженному в контроле, т.е. в не подвергнутых инъекции животных, в то время как в отличие от этого ADA-ответ в сыворотке мышей, которым инъецировали FluABwt, оказался весьма высоким как через 14 дней, так и через 21 день после i.v.-инъекции

(фиг. 28А). Кроме того, уровни ADA, установленные в день 14 после инъекции, существенно и обратно коррелировали с уровнями циркулирующего FluABwt (уровни FluAB\_wt в сыворотке снижались из-за присутствия мышинных антител против FluAB\_wt), в то время как уровни циркулирующего FluAB-MLNS, определенные в это же время, были фактически существенно более высокими и гомогенными (фиг. 28Б).

В целом, эти данные свидетельствуют о том, что неожиданно ответ против лекарственного препарата (антитела к лекарственному препарату; ADA), и, как следствие иммуногенность FluAB\_MLNS снижались по сравнению с FluAB\_wt.

Пример 10. Ответ в виде антител к лекарственному препарату и иммуногенность после s.c.-введения.

Для дополнительного подтверждения указанных неожиданных результатов в форматах, вызывающих большую иммуногенность, различным группам TG32-мышей (n=5) инъецировали либо FluAB-MLNS, либо FluAB\_wt (5 мг/кг) подкожно (s.c), что обычно рассматривается как более иммуногенный путь введения. Через 3 недели после s.c.-введения измеряли уровни антител к лекарственным препаратам ELISA (согласно методу, описанному в примере 9) в сыворотке мышей, которым инъецировали s.c. либо FluAB\_wt, либо FluAB\_MLNS. В качестве отрицательного контроля использовали пул сыворотки из 10 наивных необработанных животных.

Результаты представлены на фиг. 29. Несмотря на более иммуногенный формат опытов, у животных, обработанных s.c. FluAB-MLNS, все еще не возникал гуморальный иммуногенный ответ, что подтверждено на основе титра анти-hIgG антител в сыворотке, перекрывающего титр, обнаруженный в сыворотке не подвергнутых инъекции контрольных животных. И, наоборот, титр ADA у животных, обработанных FluAB\_wt, оказался четко позитивным и поддавался измерению у всех обработанных животных. Подтверждена обратная корреляция между циркулирующими уровнями инъецированного антитела и эндогенным анти-hIgG-ответом в сыворотке мышей, которым инъецировали только FluAB\_wt (данные не представлены).

Указанные данные являются неожиданными и демонстрируют, что антитело FluAB\_MLNS вызывает меньшей иммуногенность по сравнению с его родительским антителом FluAB\_wt.

Таблица последовательностей и SEQ ID номеров.  
(Перечень последовательностей)

SEQ ID NO	Последовательность	Комментарии
<b>FluAB_MLNS</b>		
SEQ ID NO: 1	SYNAVWN	CDRH1
SEQ ID NO: 2	RTYYRSGWYNDYAESVKS	CDRH2
SEQ ID NO: 3	SGHITVFGVNVDAFDM	CDRH3
SEQ ID NO: 4	RTSQSLSSYTH	CDRL1
SEQ ID NO: 5	AASSRGS	CDRL2
SEQ ID NO: 6	QQSRT	CDRL3
SEQ ID NO: 7	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSYNAVWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDT KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDAFDM WGQGTMTVTVSS	VH
SEQ ID NO: 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRTSQSLSSYTHWYQQK PGKAPKLLIYAASSRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK	VL
SEQ ID NO: 9	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSYNAVWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDT KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDAFDM WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSV <u>L</u> HEALH <u>S</u> HYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь
SEQ ID NO: 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRTSQSLSSYTHWYQQK PGKAPKLLIYAASSRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь
<b>FluAB_wt</b>		

SEQ ID NO: 11	<p>QVQLQQSGPGLVKPSQTLTSLTCAISGDSVSSYNVWNWI  RQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRITINPDT  KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDAFDM  WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT  HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCV  VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK  GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  QGNVFSCSV<u>M</u>HEALH<u>N</u>HYTQKSLSLSPGK</p>	Тяжелая цепь
<b>Нуклеотидные последовательности FluAB_MLNS</b>		
SEQ ID NO: 12	<p>CAAGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGTCTGGTGAAG  CCTAGCCAGACTCTGTCTTTAACTTGCGCCATCTCCGGC  GACAGCGTGAGCAGCTACAACGCCGTCTGGAAGTGGATT  CGTCAGAGCCCTAGCAGAGGTTTAGAGTGGCTGGGTCGT  ACTTACTATCGTTCGGCTGGTACAACGACTACGCCGAG  AGCGTGAAGTCTCGTATCACTATCAACCCGATACTAGC  AAGAACCAGTTCTCTTTACAGCTGAACAGCGTGACTCCC  GAAGACACTGCCGTGTAATACTGCGCTCGTAGCGGCCAC  ATCACTGTGTTCCGGCGTGAATGTGGACGCCCTTCGACATG  TGGGGCCAAGGTAATACTATGGTCACTGTGAGCAGC</p>	Нуклеотидная последовательность в VH FluAB_MLNS
SEQ ID NO: 13	<p>GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCTCTTTAAGCGCT  AGCGTGGGCGATAGGGTCACTATCACTTGTCTACTAGC  CAGTCTTTAAGCTCCTACACTCACTGGTACCAGCAGAAG  CCCGGTAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCTGCCAGC  AGCAGAGGCAGCGGAGTGCCTAGCAGATTTAGCGGCAGC  GGTAGCGGCACTGACTTCACTCTGACAATCAGCTCTTTA  CAGCCCCAAGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCT  CGTACTTTCGGCCAAGGTAATAAGGTGGAGATCAAG</p>	Нуклеотидная последовательность в VL FluAB_MLNS

SEQ ID NO: 14	CAAGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGTCTGGTGAAG CCTAGCCAGACTCTGTCTTTAACTTGCGCCATCTCCGGC GACAGCGTGAGCAGCTACAACGCCGTCTGGAACTGGATT CGTCAGAGCCCTAGCAGAGGTTTAGAGTGGCTGGGTCTGT ACTTACTATCGTTCGGGCTGGTACAACGACTACGCCGAG AGCGTGAAGTCTCGTATCACTATCAACCCCGATACTAGC AAGAACCAGTCTCTTTACAGCTGAACAGCGTGACTCCC GAAGACACTGCCGTGTACTACTGCGCTCGTAGCGGCCAC ATCACTGTGTTCGGCGTGAATGTGGACGCCCTCGACATG TGGGGCCAAGGTAATGGTCACTGTGAGCAGCGCTAGC ACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTC AAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GCCGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGCGGGTTGAGCCAAAATCTTGTGACAAA ACTCACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGCG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCC CTCCACTCCCCGAAGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCGGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCA TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAG ACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGCTGCATGAGGCT CTGCACAGCCACTACACGCAGAAGAGCCTTCCCTGTCT CCGGGTAAA	Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи FluAV_MLNS
---------------	---	--

SEQ ID NO: 15	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCTCTTTAAGCGCT AGCGTGGGCGATAGGGTCACTATCACTTGTTCGTA CAGTCTTTAAGCTCCTACACTCACTGGTACCAGCAGAAG CCCGGTAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCTGCCAGC AGCAGAGGCAGCGGAGTGCCTAGCAGATTTAGCGGCAGC GGTAGCGGCACTGACTTCACTCTGACAATCAGCTCTTTA CAGCCCCAAGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCT CGTACTTTTCGGCCAAGGTAAGGTGGAGATCAAGCGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAG TGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT	Нуклеотидная последовательность легкой цепи FluAB_MLNS
---------------	---	--

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с гемагглютинином вируса гриппа А и содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; и мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.
2. Антитело по п.1, где антитело нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А.
3. Антитело по п.2, где антитело нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гриппа А, в дозе, которая не превышает половину дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.
4. Антитело по п.3, доза которого не превышает одной третьей дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.
5. Антитело по п.3 или 4, доза которого не превышает одной пятой дозы, требуемой для нейтрализации вируса гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.
6. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело нейтрализует полиморфизмы HA1 P11S, HA2 D46N и/или HA2 N49T штамма H3 HA; и/или полиморфизм N146D штамма H1 HA.
7. Антитело по п.6, где антитело нейтрализует полиморфизмы HA1 P11S, HA2 D46N и/или HA2 N49T штамма H3 HA; и/или полиморфизм N146D штамма H1 HA, при этом кратность изменения IC<sub>50</sub> составляет < 2 относительно HA вируса дикого типа.
8. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело вызывает пониженный ответ в виде антитела к лекарственному препарату относительно применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.
9. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело обладает меньшей иммуногенностью относительно применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.
10. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой человеческое антитело.
11. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
12. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело относится к IgG-типу.
13. Антитело по п.12, где антитело относится к IgG1-типу.
14. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где легкая цепь антитела представляет собой легкую каппа-цепь.
15. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на

70% SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

16. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

17. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

18. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85% SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

19. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

20. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

21. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, в которых последовательности CDR, указанные в п.1, сохраняются.

22. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где CH3-участок антитела не содержит какой-либо дополнительной мутации кроме M428L и N434S.

23. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где Fc-область антитела не содержит какой-либо дополнительной мутации, кроме M428L и N434S.

24. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

25. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело имеет тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

26. Антитело по одному из предыдущих пунктов для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

27. Антитело по п.26, где антитело вводят профилактически.

28. Антитело по п.26 или 27, где антитело вводят в дозе, которая не превышает половину дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.

29. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной третьей дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

30. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной четвертой дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

31. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной пятой дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

32. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной шестой дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

33. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной седьмой части дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

34. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной восьмой дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

35. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной девятой дозы, требуемой для профилак-

ки или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

36. Антитело по п.28, доза которого не превышает одной десятой дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

37. Антитело по одному из пп.26-36, где индивидуум, подлежащий лечению, имеет непосредственный риск заражения вирусом гриппа А.

38. Антитело по одному из пп.26-37, где индивидуум, подлежащий лечению, страдает аутоиммунным заболеванием или аллергией; или имеет риск развития аутоиммунного заболевания или аллергии.

39. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, который кодирует антитело по одному из пп.1-25.

40. Молекула нуклеиновой кислоты по п.39, где молекула нуклеиновой кислоты содержит:

(I) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 12; и

(II) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 13.

41. Молекула нуклеиновой кислоты по п.39 или 40, где молекула нуклеиновой кислоты содержит:

(I) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 14; и

(II) полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 15.

42. Комбинация первой и второй молекул нуклеиновых кислот для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, в которой первая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по одному из пп.1-25; а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий соответствующую легкую цепь этого же антитела.

43. Комбинация первой и второй молекул нуклеиновых кислот по п.42, в которой:

(I) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 12; и

(II) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 13.

44. Комбинация первой и второй молекул нуклеиновых кислот по п.42 или 43, в которой:

(I) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 14; и

(II) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или нуклеотидную последовательность, идентичную на 70% или более SEQ ID NO: 15.

45. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пп.39-41.

46. Вектор, содержащий комбинацию молекул нуклеиновых кислот по одному из пп.42-44.

47. Клетка, экспрессирующая антитело по одному из пп.1-25 и содержащая вектор по п.45 или 46.

48. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из пп.1-25, нуклеиновую кислоту по одному из пп.39-41 или вектор по п.45 или 46 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

49. Применение антитела по одному из пп.1-25, нуклеиновой кислоты по одному из пп.39-41 вектора по п.45 или 46 или фармацевтической композиции по п.48 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для профилактики, лечения или ослабления инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

50. Применение антитела по одному из пп.1-25, нуклеиновой кислоты по одному из пп.39-41, вектора по п.45 или 46 или фармацевтической композиции по п.48 для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

51. Применение по п.50, где антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или композицию вводят в профилактическом режиме.

52. Применение по п.50 или 51, где антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или композицию вводят в комбинации с противовирусным препаратом.

53. Применение по п.52, где противовирусный препарат выбирают из ингибиторов нейраминидазы и ингибиторов полимеразы гриппа.

54. Применение по п.52 или 53, где противовирусный препарат выбирают из осельтамивира, занамивира и балоксавира.

55. Применение по одному из пп.50-54, где индивидуум, подлежащий лечению, страдает аутоиммунным заболеванием или аллергией; или имеет риск развития аутоиммунного заболевания или аллергии.

56. Комбинация для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, содер-

жащая:

(I) антитело по одному из пп.1-25 и

(II) антивирусный агент.

57. Комбинация по п.56, в которой антивирусный препарат выбран из ингибиторов нейраминидазы и ингибиторов полимеразы гриппа.

58. Комбинация по п.56 или 57, в которой антивирусный препарат выбран из осельтамивира, занамивира и балоксавира.

59. Комбинация по одному из пп.56-58 для профилактики или лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А.

60. Способ снижения инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, или снижения риска заражения вирусом гриппа А, включающий введение индивидууму, который нуждается в этом, в терапевтически эффективном количестве антитела по одному из пп.1-25.

61. Способ по п.60, в котором антитело вводят в профилактическом режиме.

62. Способ по п.60 или 61, в котором антитело вводят в дозе, которая не превышает половину дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании применяемого для сравнения антитела, которое отличается от указанного антитела только тем, что не содержит мутации M428L и N434S в константной области тяжелой цепи.

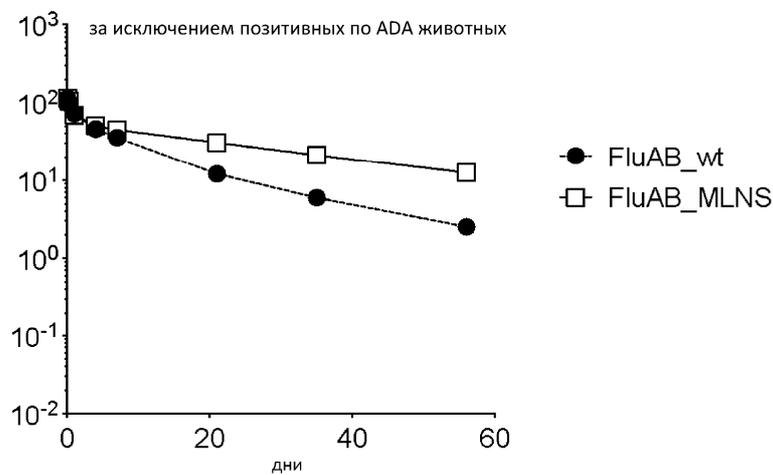
63. Способ по п.62, в котором доза не превышает одной третьей дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

64. Способ по п.62, в котором доза не превышает одной пятой дозы, требуемой для профилактики или лечения гриппа А при использовании указанного применяемого для сравнения антитела.

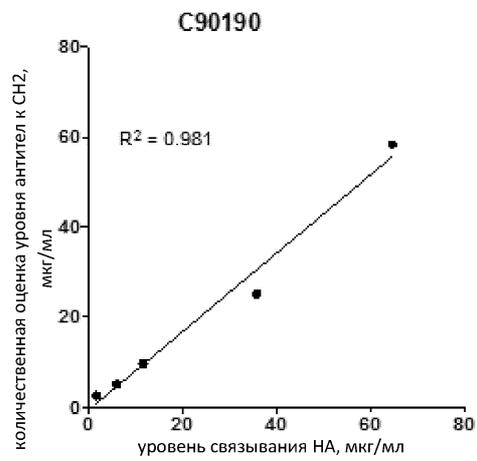
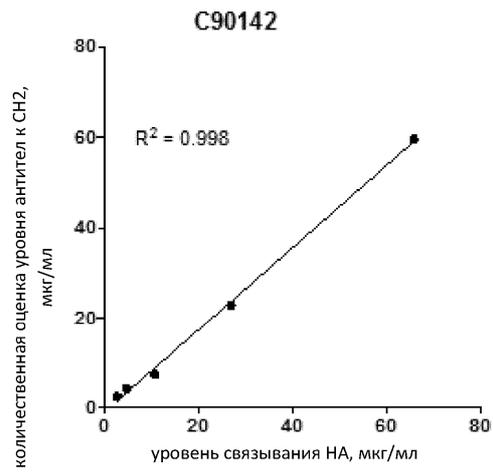
65. Способ по одному из пп.60-64, в котором индивидуум, подлежащий лечению, имеет непосредственный риск заражения вирусом гриппа А.

66. Способ по одному из пп.60-65, в котором антитело вводят в комбинации с антивирусным препаратом.

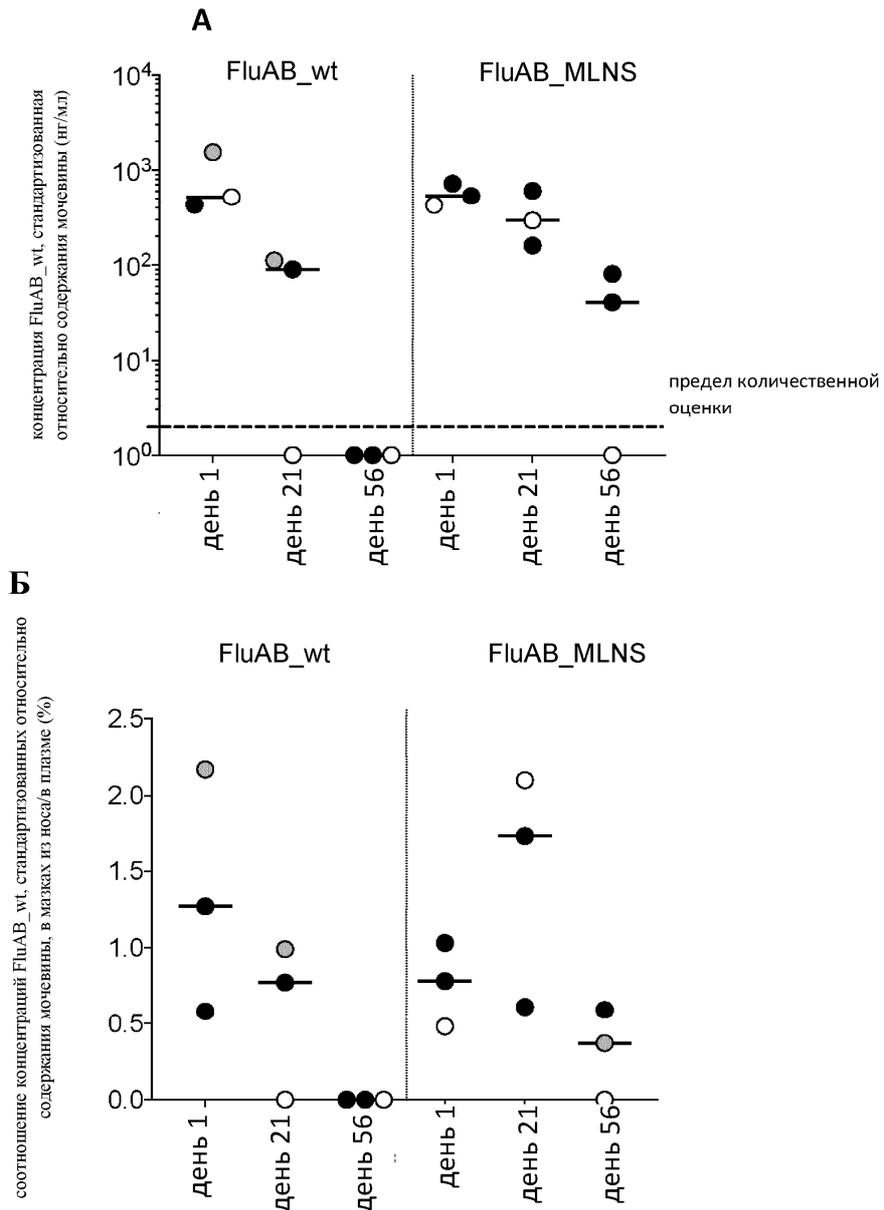
67. Способ снижения иммуногенности антитела, которое содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; включающий стадию интродукции мутаций M428L и N434S в константную область тяжелой цепи антитела.



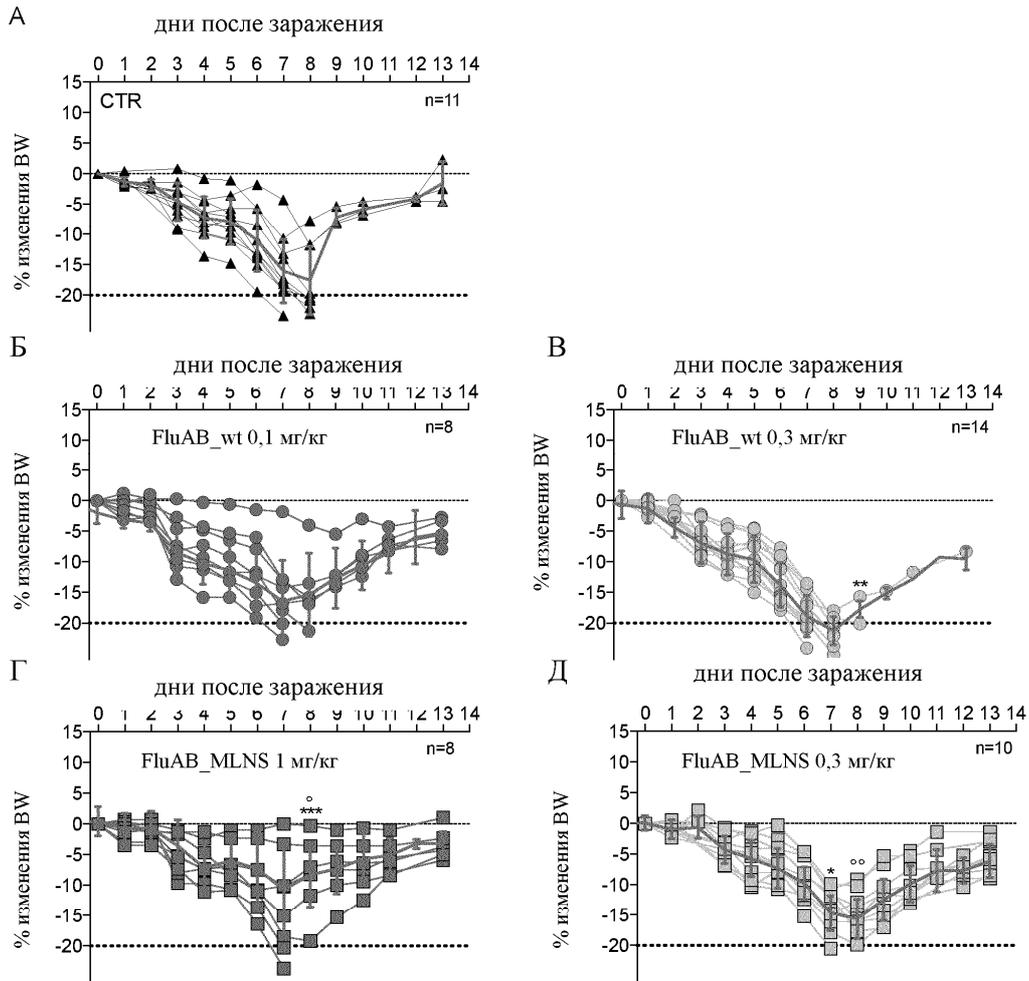
048000



Фиг. 2

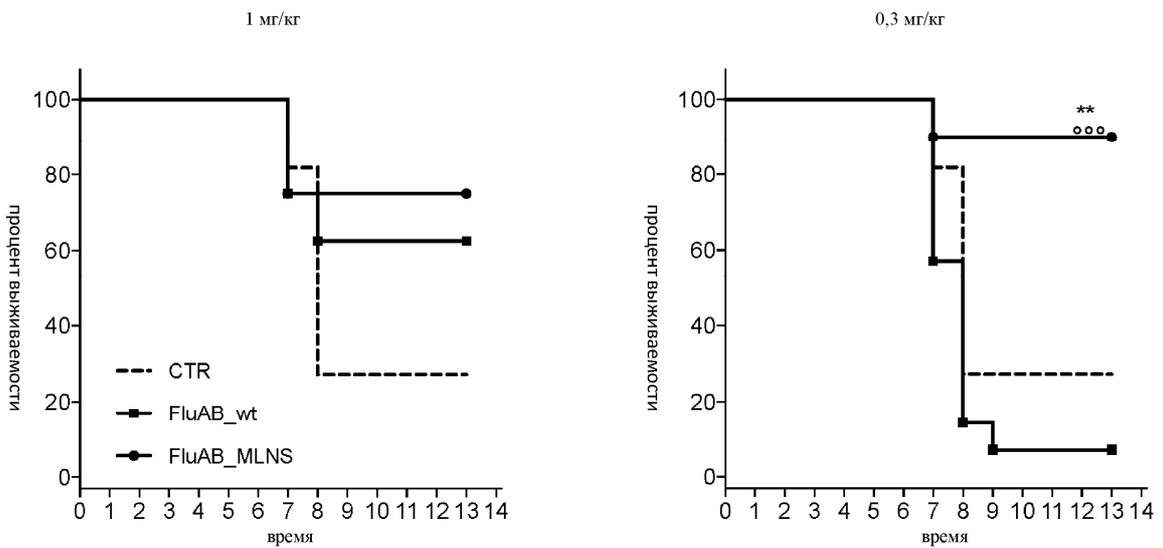


Фиг. 3

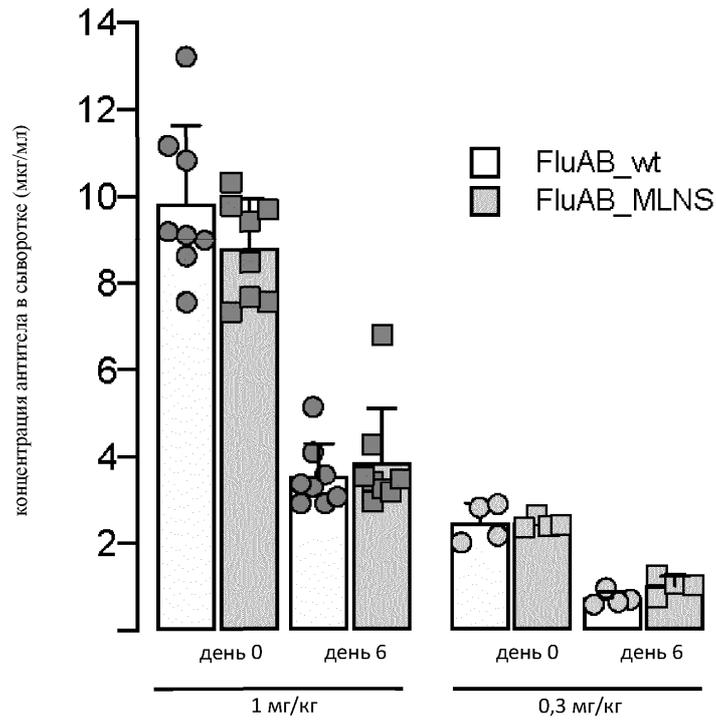


\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  при сравнении с контролем  
 $^{\circ}p < 0,05$   $^{\circ\circ}p < 0,01$  при сравнении с FluAB\_wt

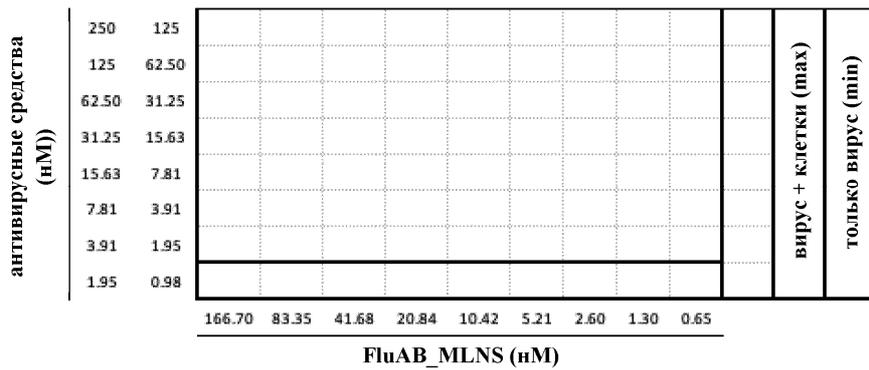
Фиг. 4



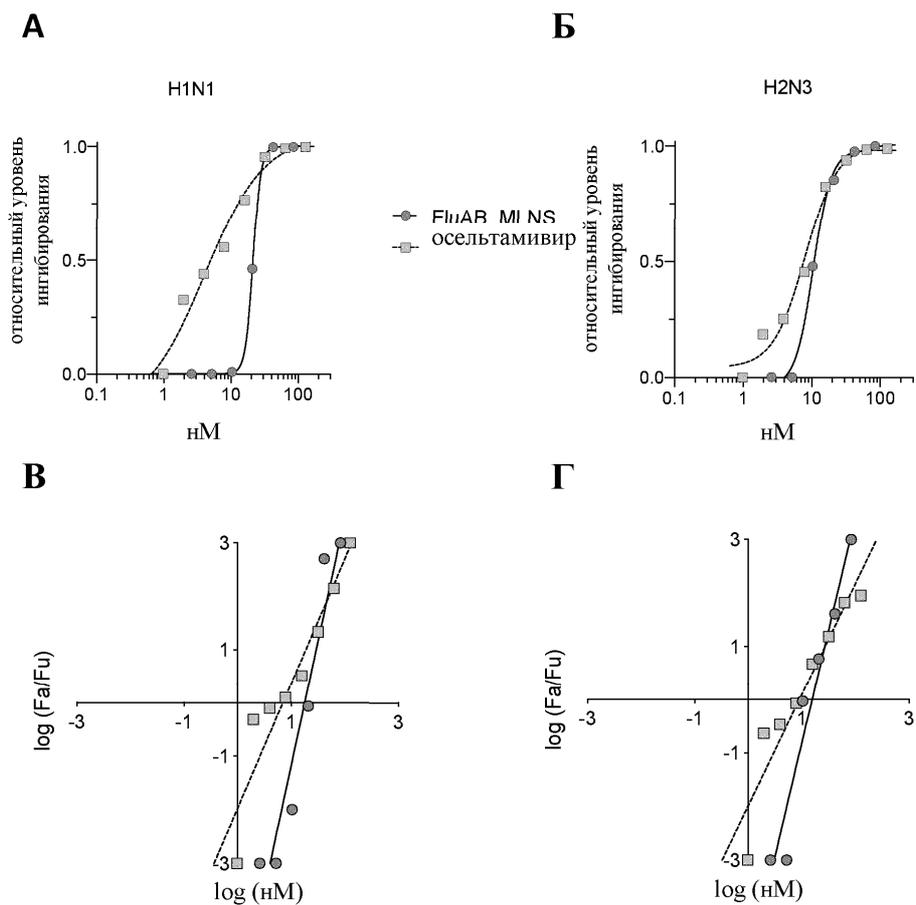
Фиг. 5



Фиг. 6

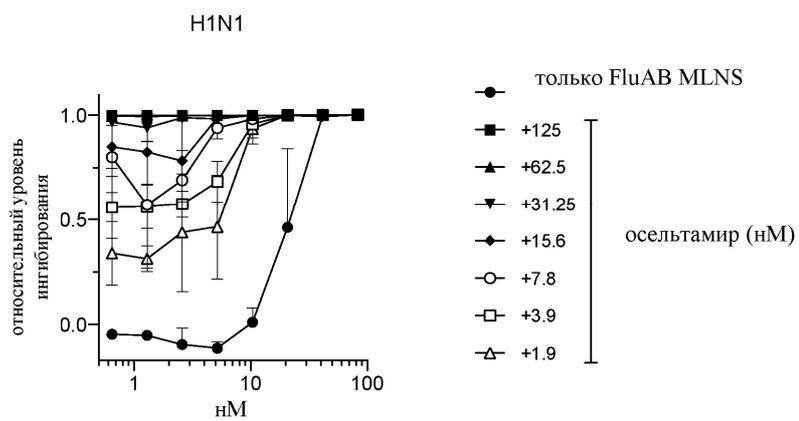


Фиг. 7

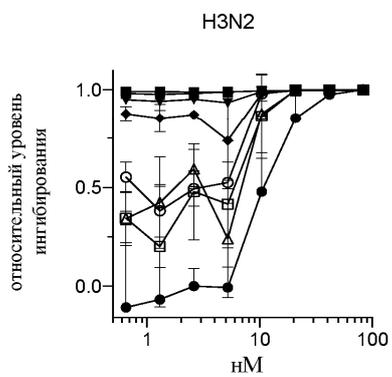


Фиг. 8

А

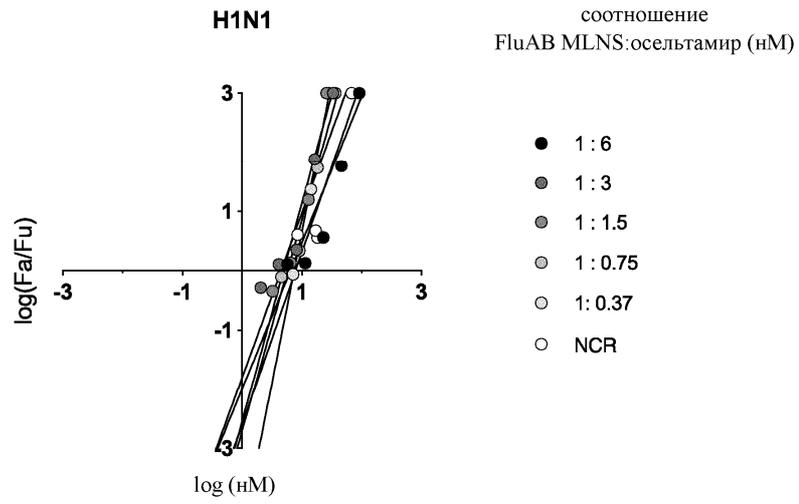


Б

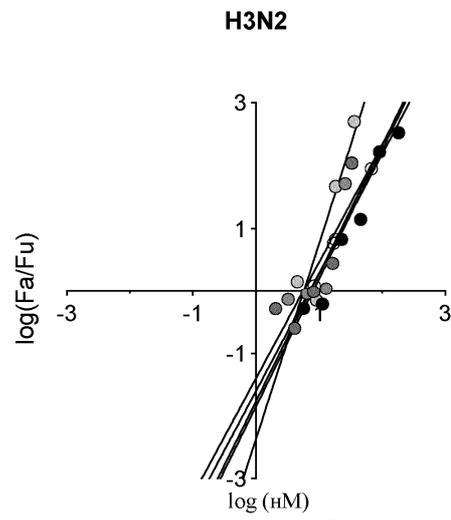


Фиг. 9

**А**

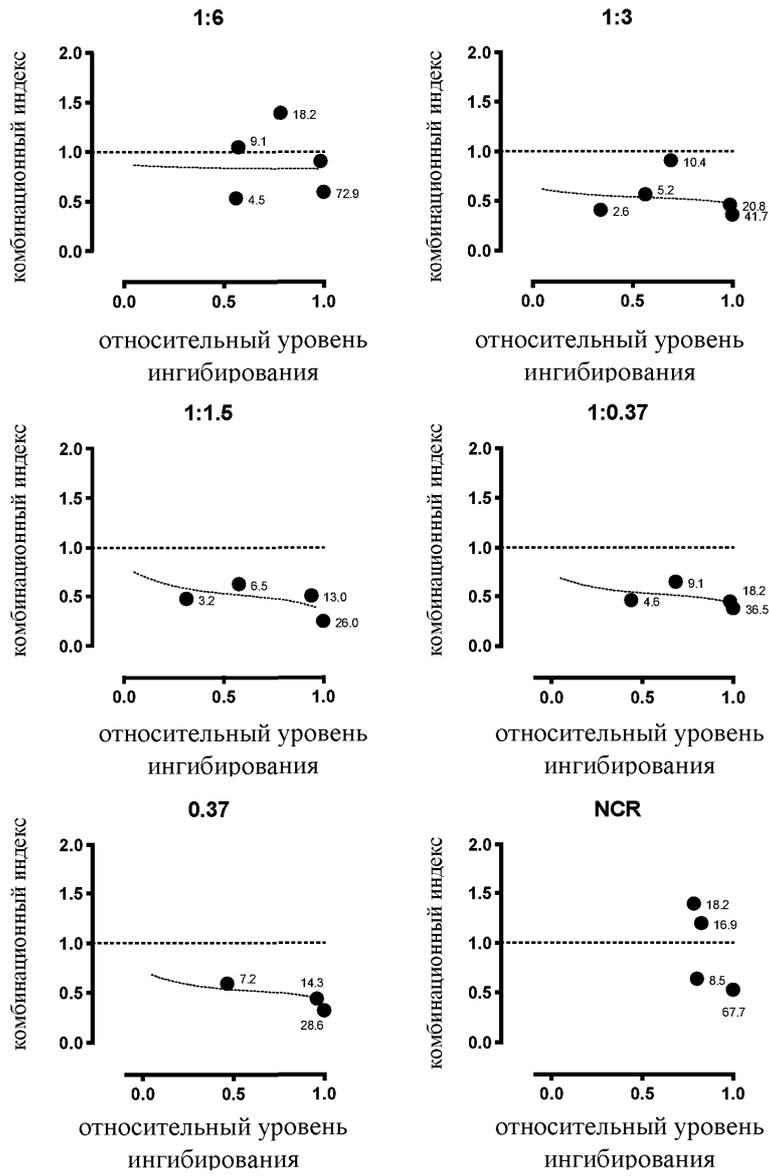


**Б**



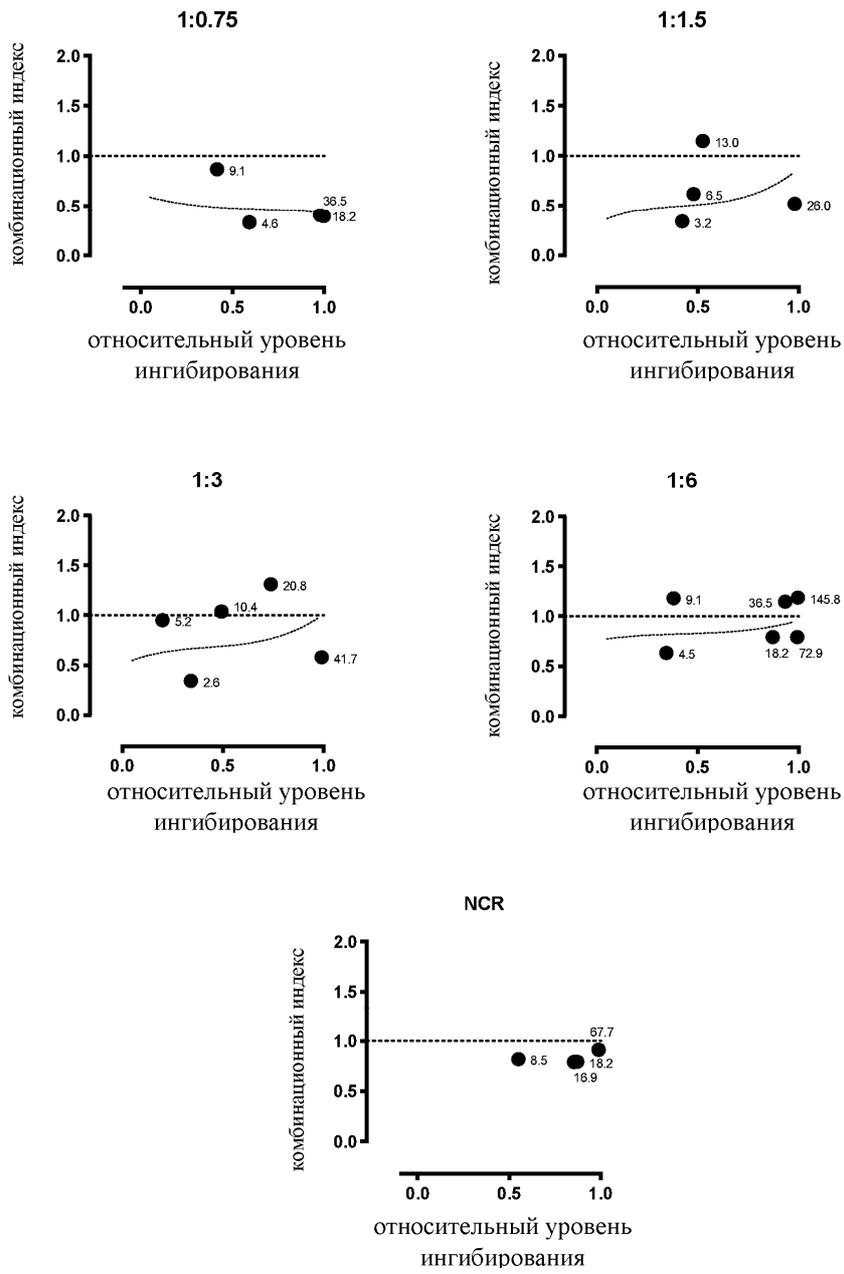
Фиг. 10

H1N1



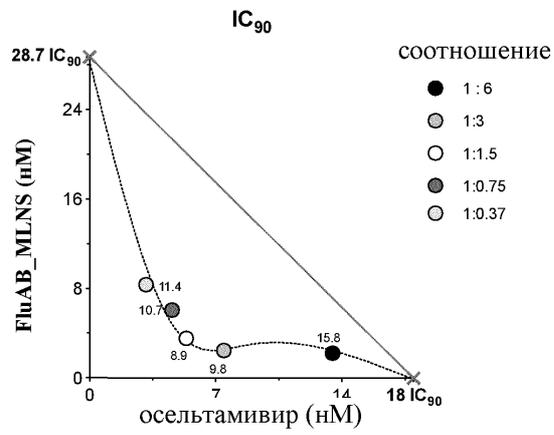
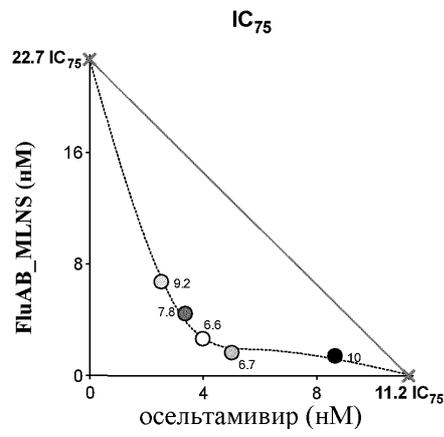
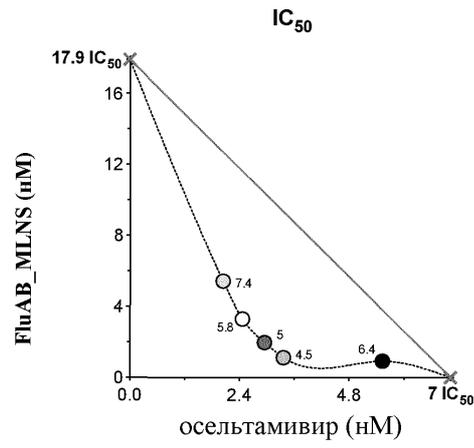
Фиг. 11

H3N2



Фиг. 12

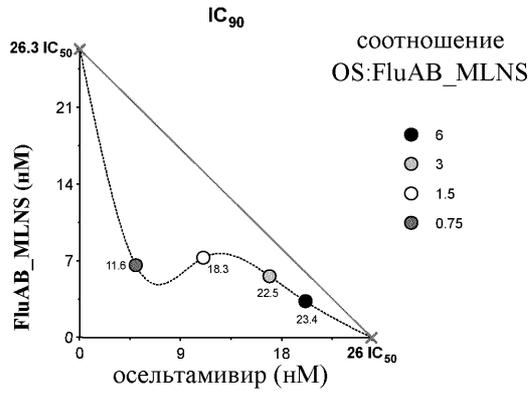
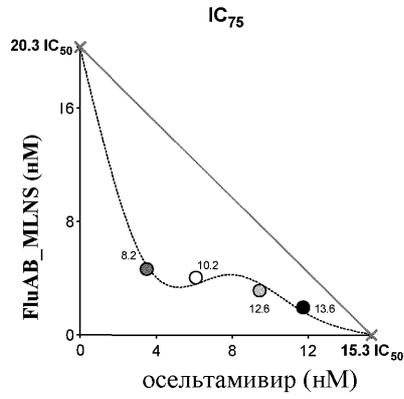
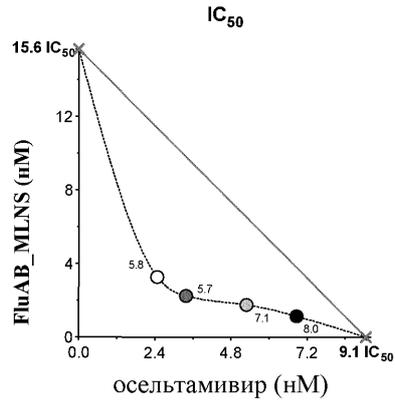
H1N1



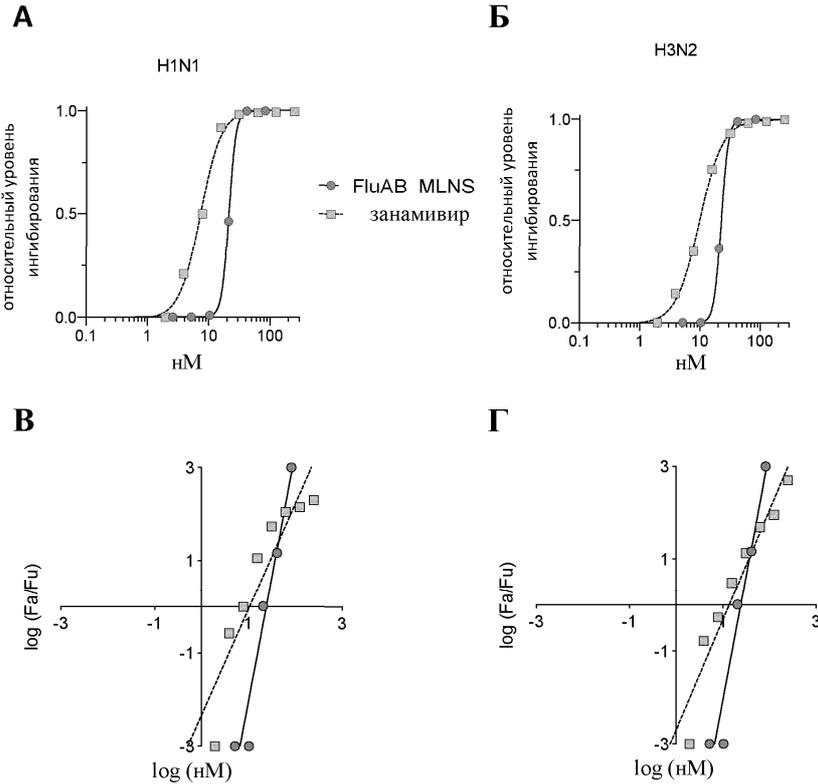
Фиг. 13

048000

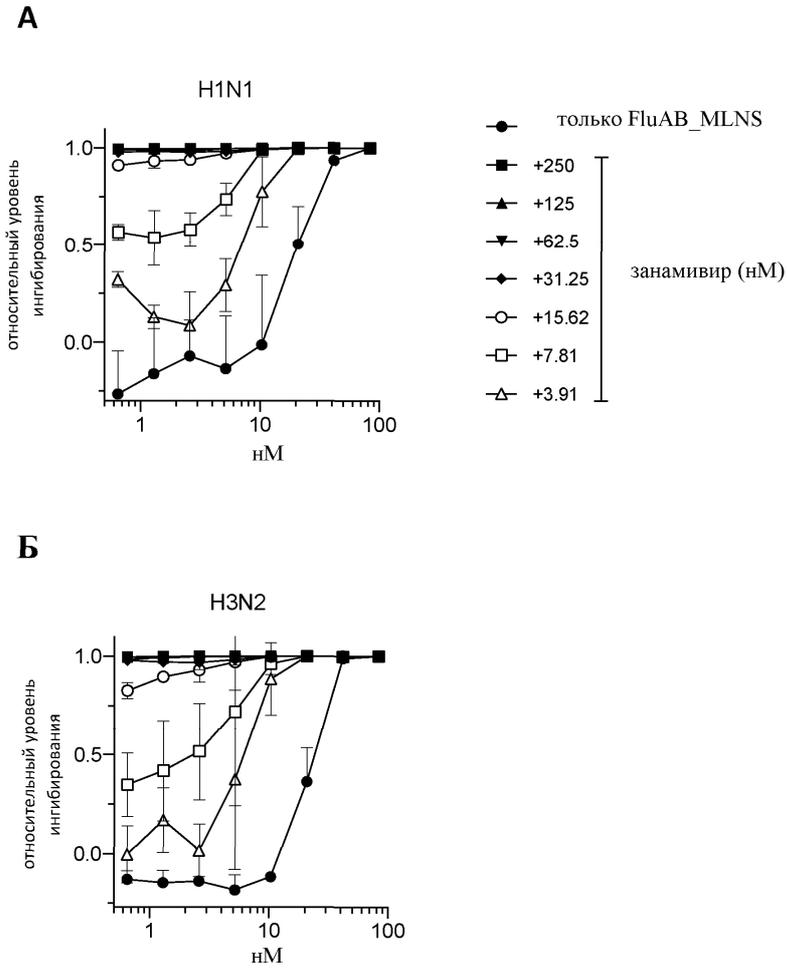
H3N2



Фиг. 14

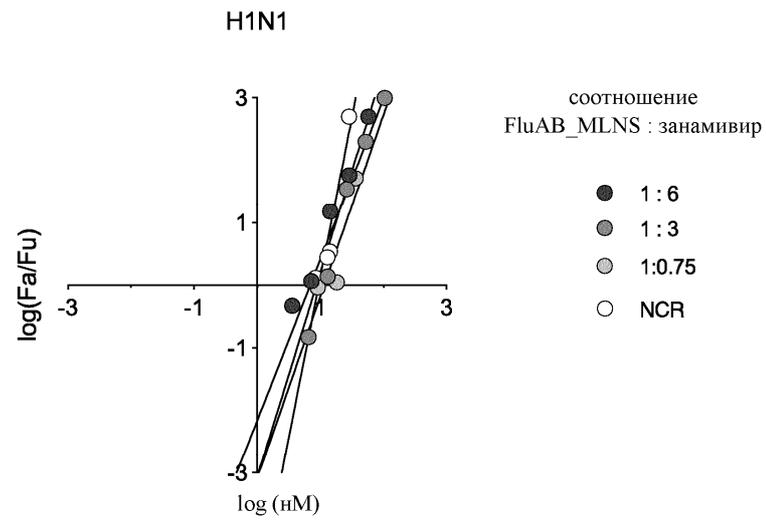


Фиг. 15

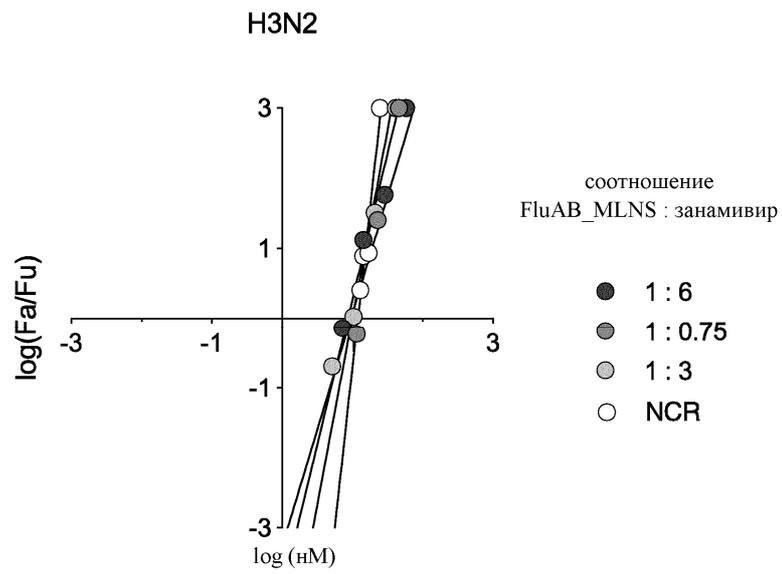


Фиг. 16

**А**

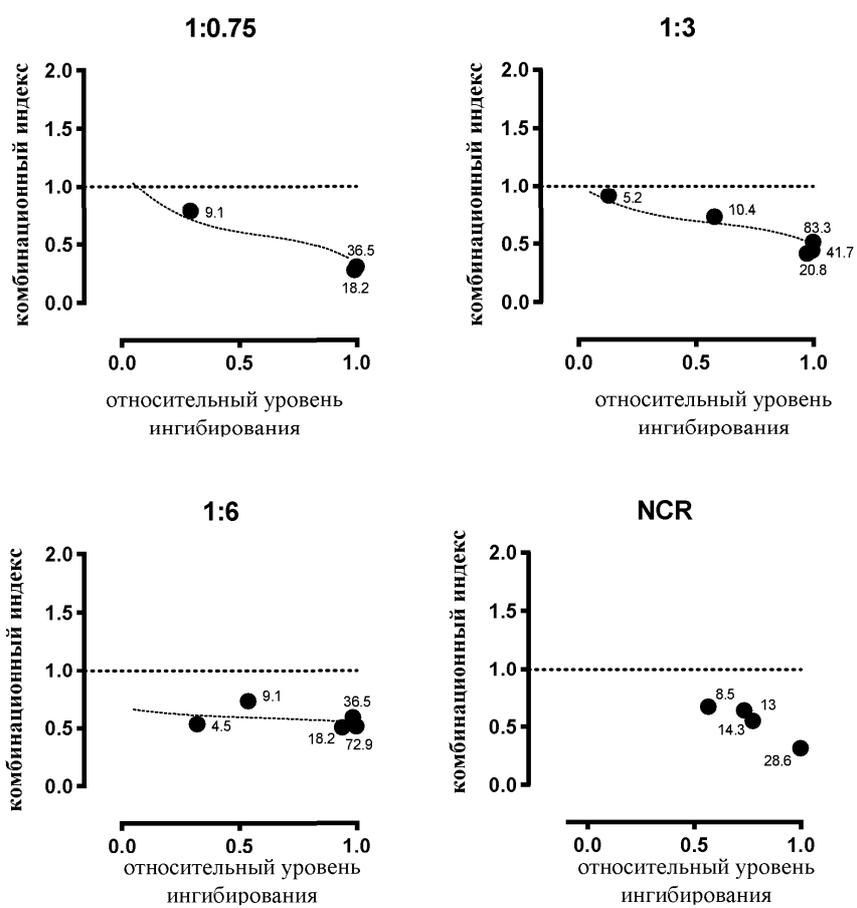


**Б**



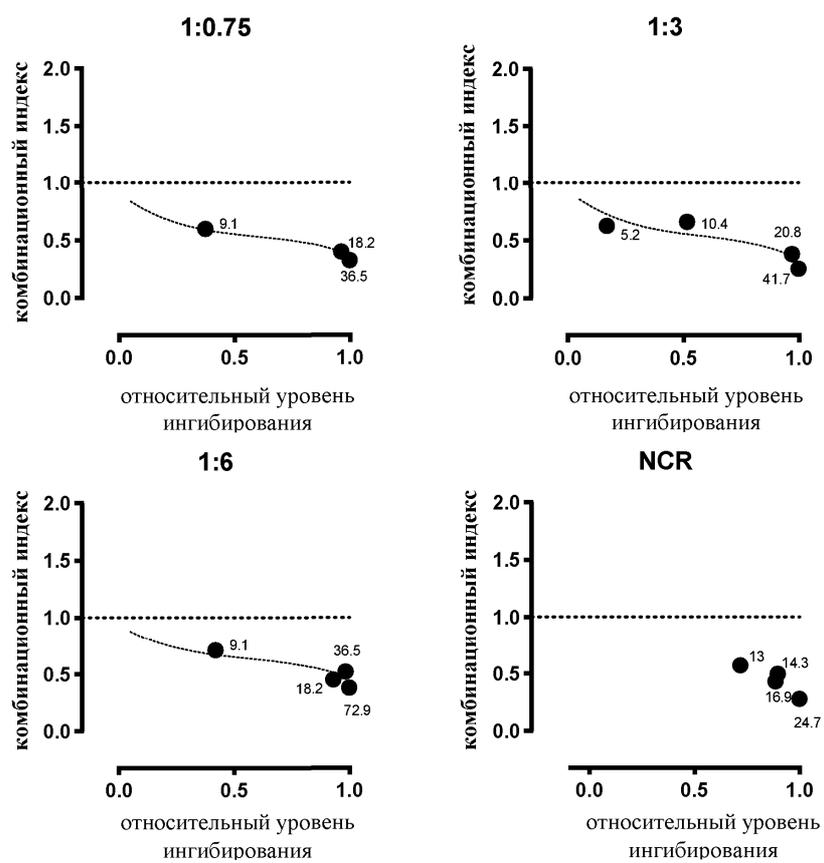
Фиг. 17

H1N1



Фиг. 18

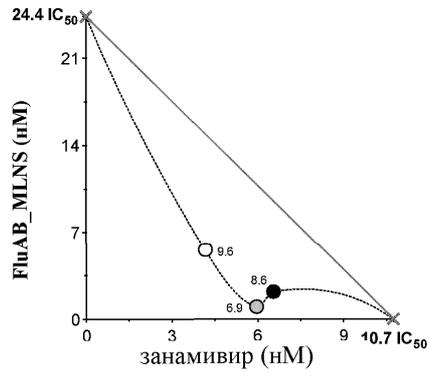
H3N2



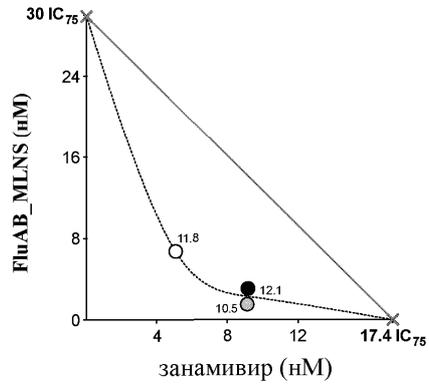
Фиг. 19

H1N1

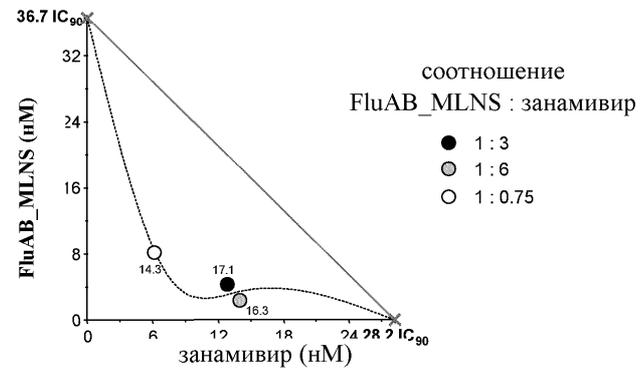
IC<sub>50</sub>



IC<sub>75</sub>



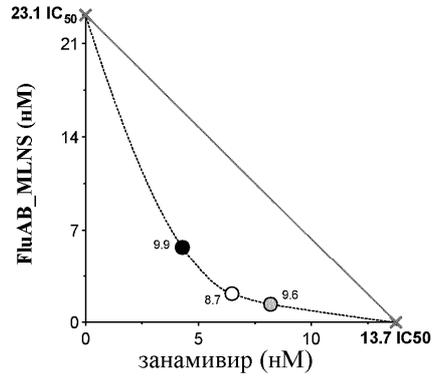
IC<sub>90</sub>



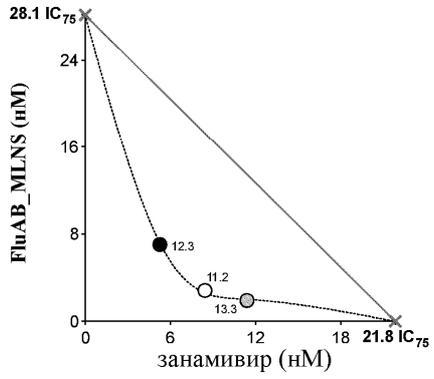
Фиг. 20

H3N2

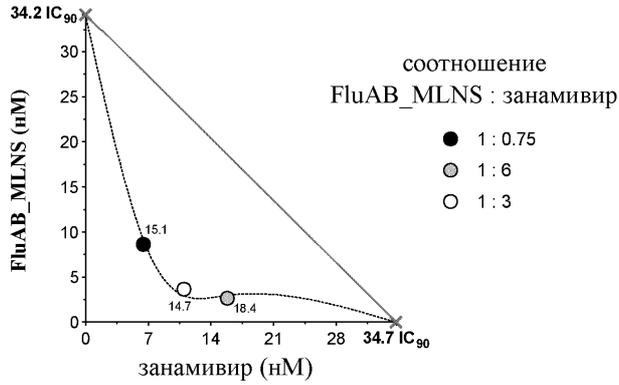
IC<sub>50</sub>



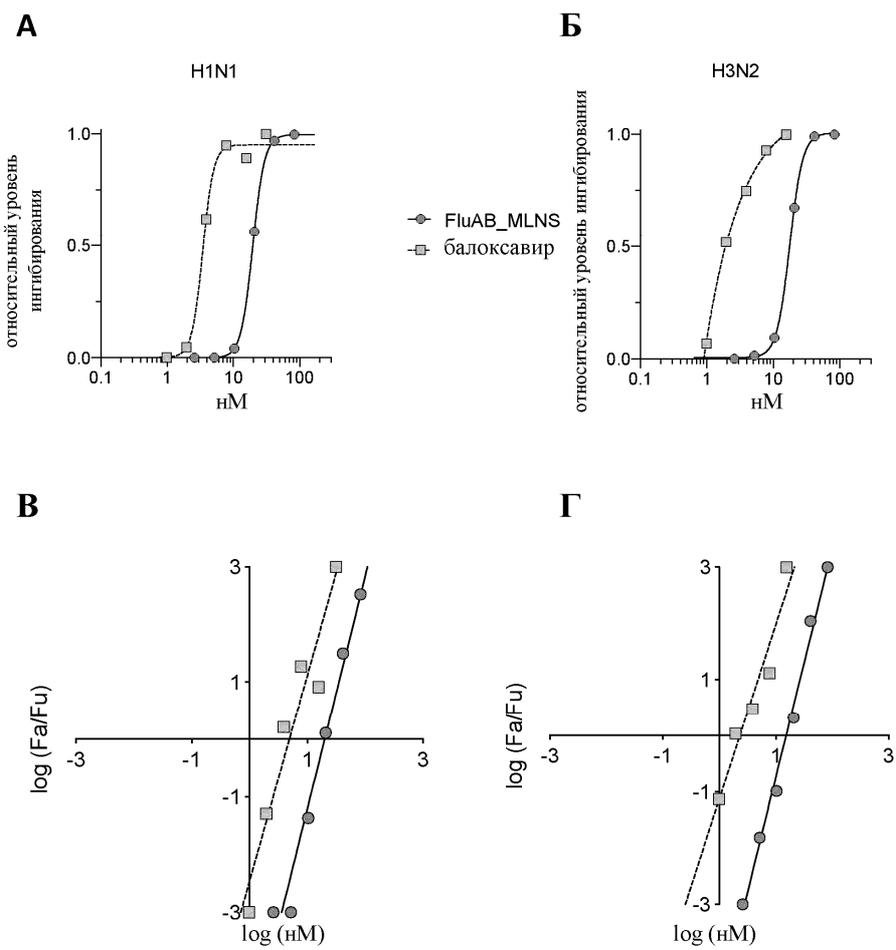
IC<sub>75</sub>



IC<sub>90</sub>

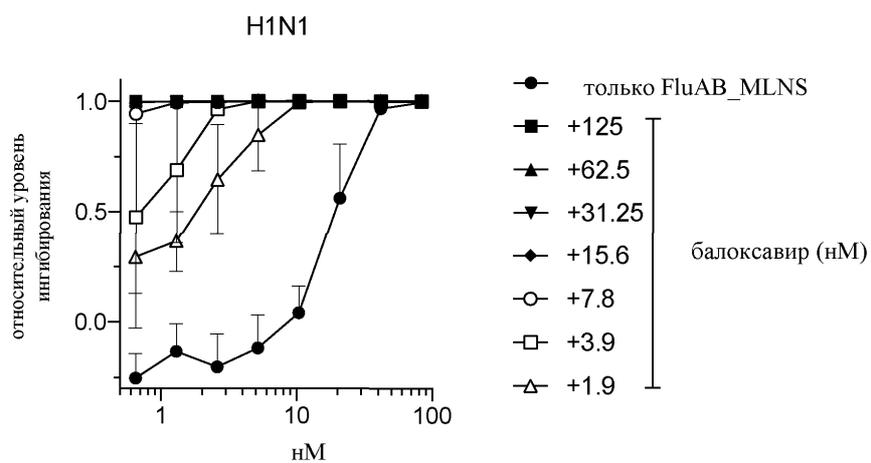


Фиг. 21

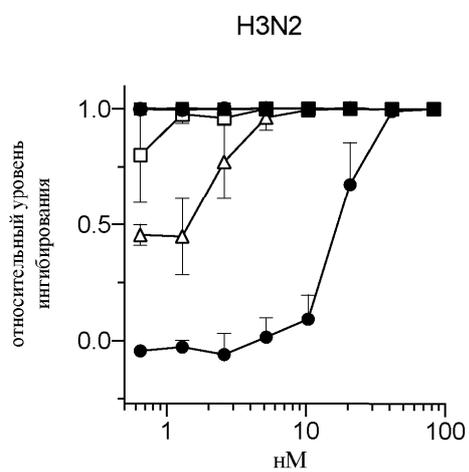


Фиг. 22

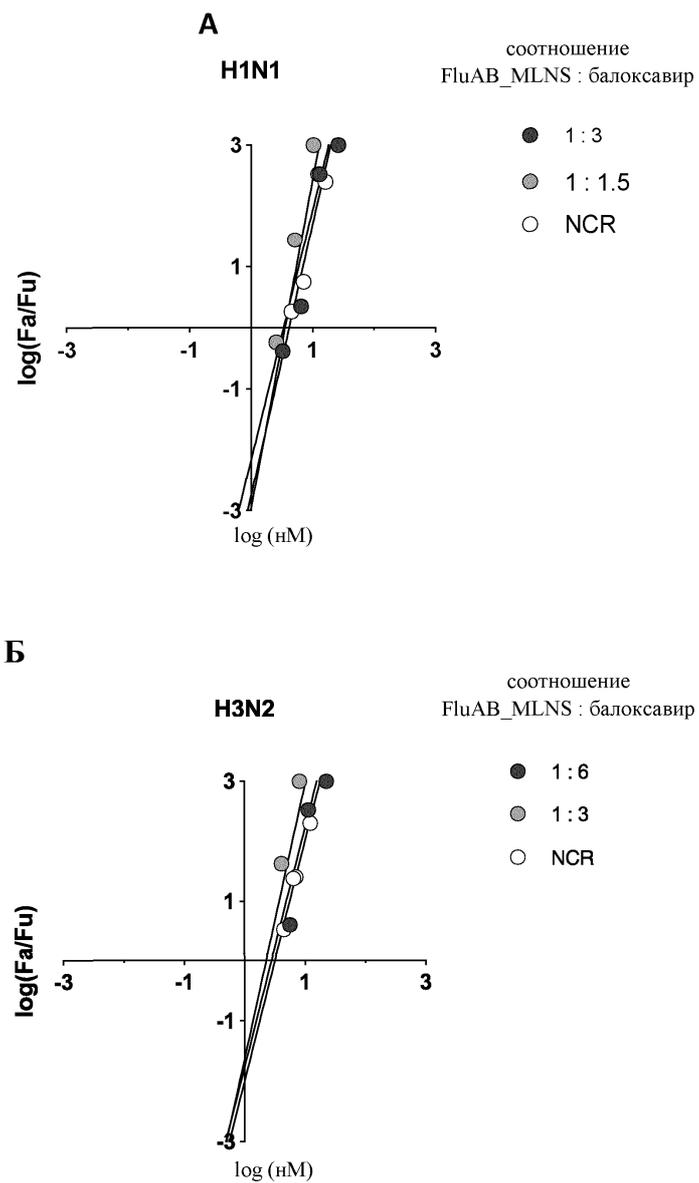
А

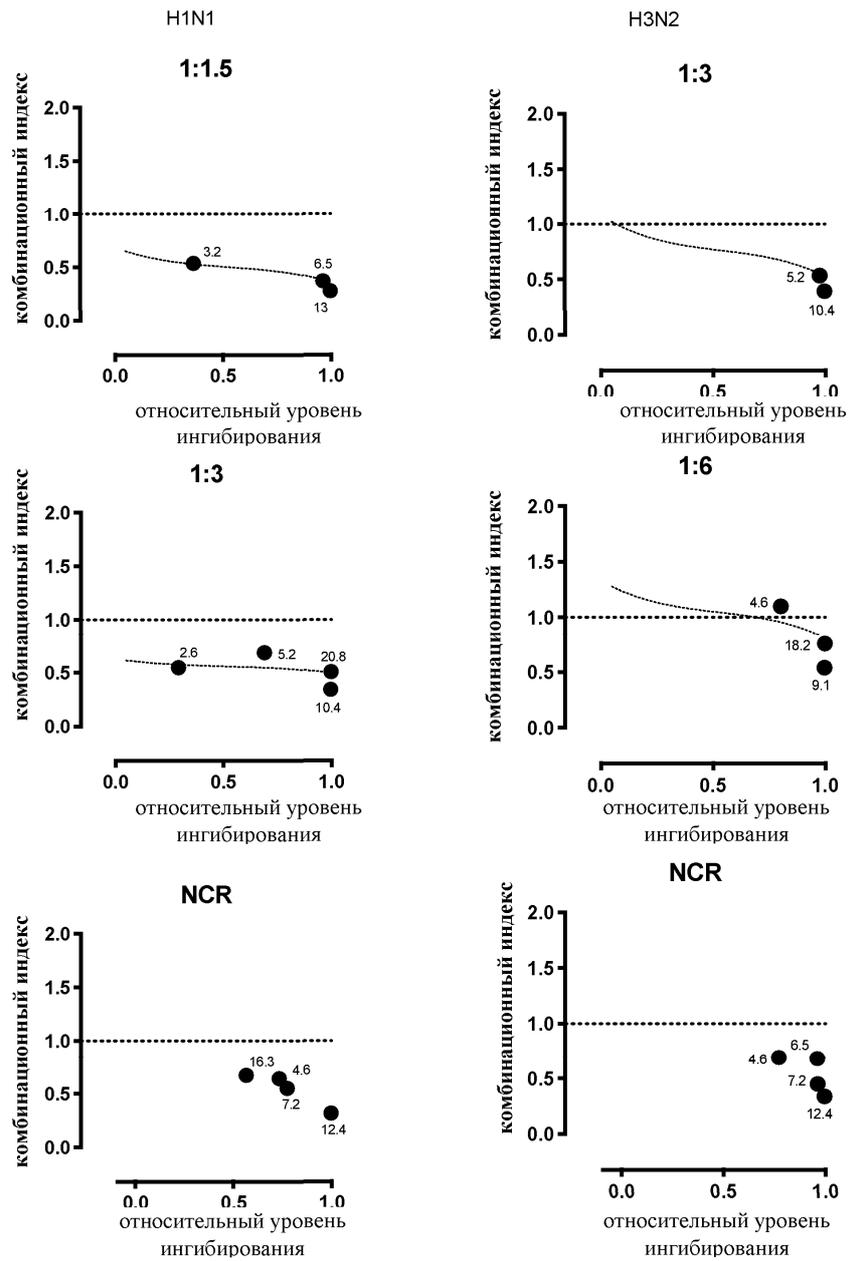


Б

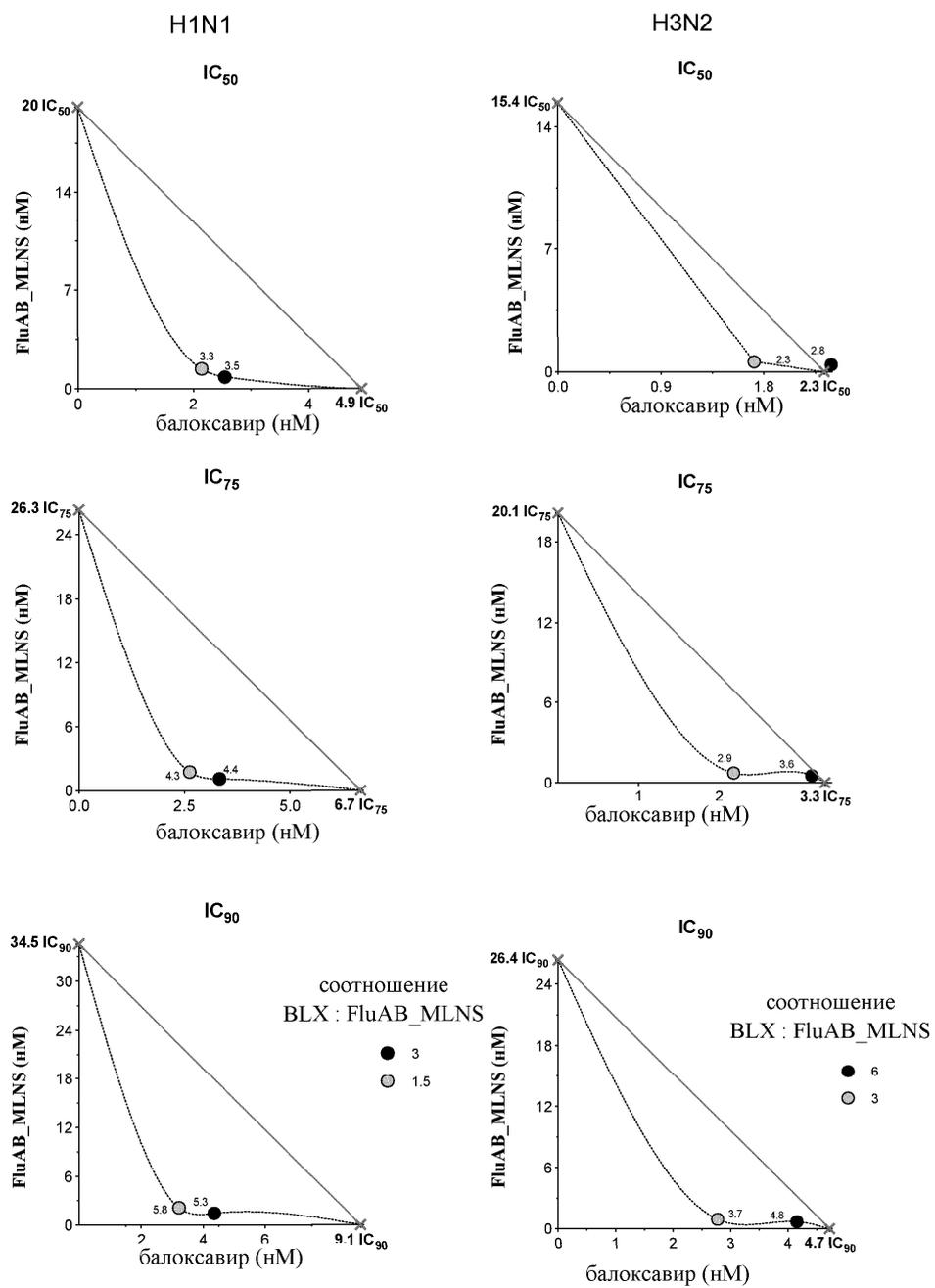


Фиг. 23

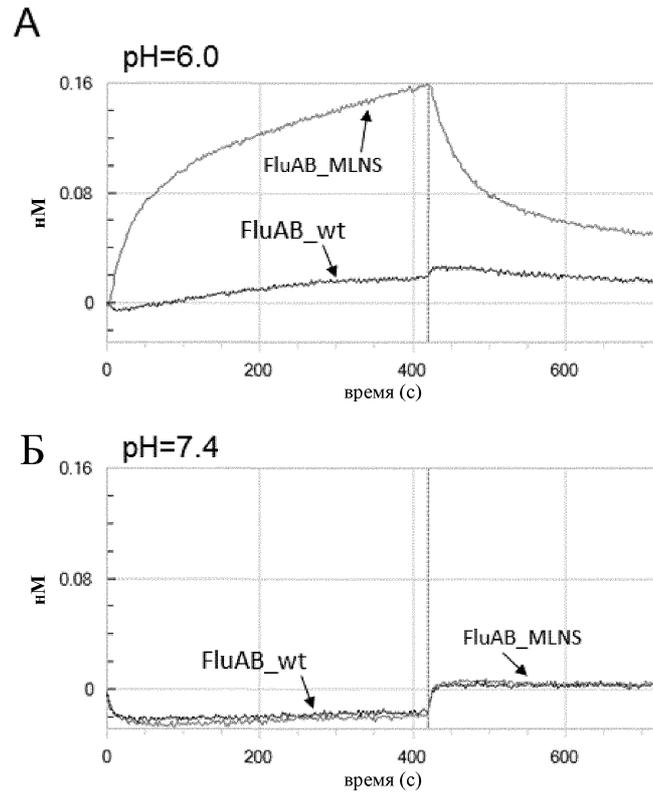




Фиг. 25

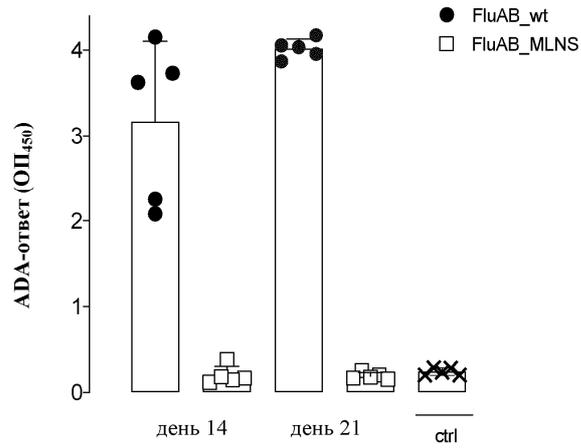


Фиг. 26

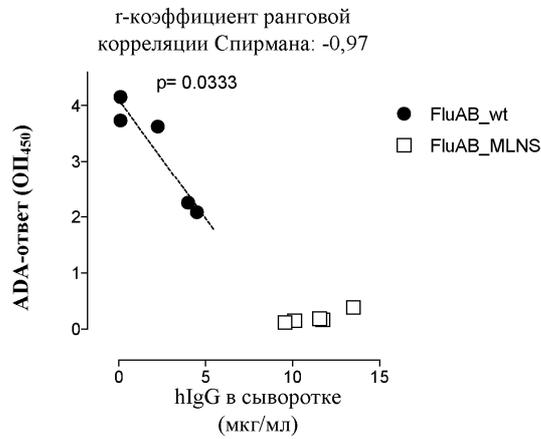


Фиг. 27

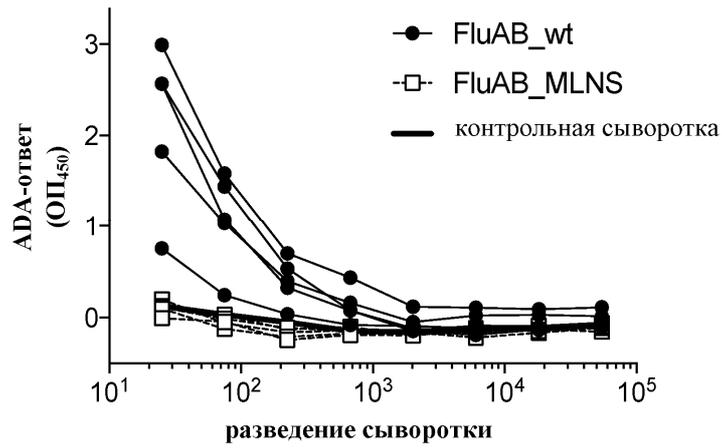
**А**



**Б**



Фиг. 28



Фиг. 29

