

Даний винахід стосується антитіл, які ефективно знижують інфекцію, яка викликається вірусом грипу А, та застосування зазначених антитіл. Зокрема, винахід стосується профілактики та лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А.

Грип являє собою інфекційне захворювання, яке поширене у всьому світі із щорічними спалахами, викликаючи приблизно від трьох до п'яти мільйонів випадків серйозного захворювання на рік й приблизно від 290000 до 650000 смертей від респіраторних захворювань (WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 6 листопада 2018 р.). Найбільш поширені симптоми включають: раптове підвищення температури, кашель (зазвичай сухий), головний біль, м'язовий та суглобовий біль, серйозний дискомфорт (погане самопочуття), біль у горлі та нежить. Період інкубації варіюється від одного до чотирьох днів, хоча зазвичай симптоми починають проявлятися приблизно через два дні після контакту з вірусом. Ускладненнями грипу можуть бути пневмонія, синусити та погіршення наявних раніше проблем зі здоров'ям, таких як астма або серцева недостатність, сепсис або загострення основних хронічних захворювань.

Грип викликається вірусом грипу, антигенно та генетично різноманітною групою вірусів сімейства Orthomyxoviridae, геном яких представлений негативною полярною одноланцюговою сегментованою РНК. З чотирьох типів вірусу грипу (А, В, С та D) три типи (А, В та С) уражують людей. Віруси грипу типу А являють собою найбільш вірулентні патогени людини та викликають найбільш серйозне захворювання. Віруси грипу А можна класифікувати на основі різних підтипів присутніх основних поверхневих білків: гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA). Відомо принаймні 18 підтипів вірусу грипу А, які визначаються їх білками гемаглютиніну ("HA"). HA можна поділяти на дві групи. Група 1 містить підтипи H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 та H17, а група 2 містить підтипи H3, H4, H7, H10, H14 та H15. У той час як усі підтипи присутні у птахів, захворювання у людей здебільшого викликаються підтипами H1, H2 та H3. Підтипи H5, H7 та H9 викликають серйозні спорадичні інфекції у людей та можуть призводити до нової пандемії. Віруси грипу А постійно еволюціонують, створюючи нові варіанти, це явище називають антигенним дрейфом. Як наслідок, антитіла, вироблені у відповідь на останні віруси, погано захищають або взагалі не захищають від нових вірусів, які "дрейфують". В результаті потрібно щороку отримувати нову вакцину проти вірусів H1 та H3, які за прогнозами можуть з'явитися, цей процес є дуже дорогим, а також не завжди ефективним. Аналогічно, це також стосується виробництва вакцини проти вірусу грипу H5.

HA являє собою основний поверхневий білок вірусу грипу А, який являє собою основну мішень нейтралізуючих антитіл, які індукуються інфекцією або вакцинацією. HA відповідає за зв'язування вірусу з клітинами з сіаловою кислотою на мембранах, такими як клітини у верхніх дихальних шляхах або еритроцити. Крім того, HA опосередковує злиття вірусної оболонки з мембраною ендосоми після зниження рН. HA являє собою гомотримерний мембранний інтегральний глікопротеїн. Тример HA складається з трьох ідентичних мономерів, кожен з яких утворений з одиничного поліпептидного ланцюга інтактного HA0 з ділянками HA1 і HA2, з'єднаними за допомогою двох дисульфідних містків. Кожна HA2-ділянка приймає альфа-спіральну структуру "coiled coil" і краще утворює ділянку "стовбура" або "стебла" HA, тоді як HA1-ділянка являє собою невеликий глобулярний домен, який містить суміш α/β -структур ("головна" ділянка HA). Глобулярна головна ділянка HA опосередковує зв'язування з сіаловою кислотою-рецептором, тоді як стовбур HA опосередковує наступне злиття між вірусами та клітинними мембранами, що запускається в ендосомах при зниженні значення рН. У той час як імунодомінантний глобулярний головний домен HA має високу пластичність, за якої різні антигенні сайти постійно піддаються антигенному дрейфу, стовбура ділянка HA є відносно консервативною серед підтипів. Сучасні вакцини проти грипу головним чином індукують імунну відповідь проти імунодомінантної та варіабельної головної ділянки HA, яка еволюціонує швидше, ніж стовбура ділянка HA (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 липня 2018 р., с. 10432). Таким чином, конкретна вакцина проти грипу, як правило, забезпечує захист протягом не більше ніж декілька років і потрібна щорічна реконструкція вакцин проти грипу.

Для вирішення зазначених проблем в останні роки розроблений новий клас антитіл, які нейтралізують вірус грипу, мішенню яких є консервативні сайти в стовбурі HA, як терапія проти вірусу грипу. Ці антитіла, які таргетують стовбурову ділянку HA, як правило, мають більш широкий спектр нейтралізації в порівнянні з антитілами, які таргетують головну ділянку HA. Огляд нейтралізуючих антитіл проти вірусу грипу А, які мають широкий спектр дії, представлений у Corti D. та Lanzavecchia A., Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 2013, сс. 705–742. У Okuno із співавторами описана імунізація мишей вірусом грипу A/Okuda/57 (H2N2) та виділення моноклонального антитіла (C179), яке зв'язується з консервативним конформаційним епітопом у HA2 та нейтралізує підтипи H2, H1 й H5 групи 1 вірусів грипу А, *in vitro* та на тваринних моделях *in vivo* (Okuno та ін., 1993; Smirnov та ін., 1999; Smirnov та ін., 2000). Інші приклади антитіл, які таргетують стовбурову ділянку HA, включають CR6261 (Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L.M., Alard P., Cornelissen L. та ін. Heterosubtypic Neutralizing Monoclonal Antibodies Cross-Protective against H5N1 and H1N1 Recovered from Human IgM⁺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. та ін. 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), березень 2009 г., сс. 265–273. doi:10.1038/nsmb.1566), CR8020 (Ekiert D.C., Friesen R.H.E., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M. та ін. A highly

conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333(6044), 2011, cc. 843–850), F16 (Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A. та ін. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333(6044), 2011, cc. 850–856) та CR9114 (Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgheest D., Khayat R. та ін. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 337(6100), 2012, cc. 1343–1348).

Однак антитіла, які мають здатність давати реакцію зі стовбуровою ділянкою НА підтипів з обох груп 1 та 2, є дуже рідкісними і, як правило, для них не встановлена здатність повністю охоплювати всі підтипи. В останні роки описане антитіло MEDI8852, яке ефективно нейтралізує віруси грипу А груп 1 та 2 з безпрецедентною широтою, має здатність нейтралізувати різноманітну панель репрезентативних вірусів, які виникли протягом >80 років еволюції антигенів (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. та ін. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell* 166(3), 2016, cc. 596-608; Paules C. I. та ін. The Hemagglutinin A Stem Antibody MEDI8852 Prevents and Controls Disease and Limits Transmission of Pandemic Influenza Viruses. *J Infect Dis* 216, 2017, cc. 356–365, <https://doi.org/10.1093/infdis/jix292>). Встановлено, що MEDI8852 зв'язується з високо консервативним епітопом, що суттєво відрізняє його від нейтралізуючих антитіл, реактивних щодо інших структурно охарактеризованих стовбурів (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. та ін. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell*, 166(3), 2016, cc. 596-608).

У світлі вищесказаного, задачею, покладеною в основу даного винаходу, було одержання нового антитіла, яке максимально широко та ефективно нейтралізує вірус грипу А, навіть при введенні у дуже низьких дозах.

Зазначена задача вирішується за допомогою об'єктів винаходу, представлених нижче і у доданій формулі винаходу.

Хоча даний винахід детально описаний нижче, має бути очевидно, що вказаний винахід не обмежується конкретними методологіями, протоколами й реагентами, зазначеними в даному описі, які можуть варіюватися. Крім того, має бути очевидно, що термінологія, яка застосовується в даному описі, не спрямована на обмеження обсягу винаходу, який може бути обмежений лише доданою формулою винаходу. Якщо не вказано інше, то всі технічні та наукові поняття, які вживаються в даному описі, мають загальноприйняті значення, відомі пересічному спеціалісту в даній галузі.

Нижче описані елементи даного винаходу. Зазначені елементи перераховані з використанням конкретних варіантів здійснення винаходу, проте, як має бути очевидно, їх можна об'єднувати будь-яким чином й створювати будь-яку кількість додаткових варіантів здійснення винаходу. Не слід вважати, що різні описані приклади й варіанти здійснення винаходу обмежують даний винахід тільки конкретно описаними варіантами здійснення. Слід розуміти, що даний опис підтверджує й охоплює варіанти здійснення винаходу, які об'єднують спеціально описані варіанти здійснення винаходу з будь-якою кількістю заявлених елементів. Крім того, будь-які варіанти й комбінації всіх описаних в даній заявці елементів слід розглядати як включені в дану заявку, якщо із контексту не випливає інше.

У даному описі й в доданій формулі винаходу, якщо з контексту не вимагається інше, мається на увазі, що поняття "містять" та його варіації, такі як "містить" та "який містить" включає вказаний елемент, ціле число або стадію, але не виключає будь-які інші не вказані елемент, ціле число або стадію. Поняття "складаються з" являє собою конкретний варіант поняття "містять", з якого виключені будь-які інші не вказані елемент, ціле число або стадію. У контексті даного винаходу поняття "містять" включає поняття "складаються з". Таким чином, під поняття "містить" підпадають поняття "включає", а також "складається", наприклад, композиція, "яка містить" X, може складатися виключно з X або може включати додатковий компонент, наприклад, X+Y.

Вживання поняття в однині та аналогічні посилання в контексті опису винаходу (перш за все в контексті формули винаходу) стосується його вживання і в однині, і у множині, якщо в даному описі не вказано інше або якщо це явно суперечить контексту. Перерахування діапазонів величин в даному описі виключно служить для скорочення методу посилання індивідуально на кожну окрему величину, що підпадає під вказаний діапазон. Якщо в даному описі не вказано інше, то кожна індивідуальна величина включена в опис таким чином, як якщо б вона була індивідуально вказана в даному описі. Жодну мову, яка вживається в даному описі, не слід розглядати як вказівку на будь-який незазвичайний і важливий для втілення винаходу на практиці елемент.

Поняття "практично" не виключає "повністю", наприклад, композиція, яка "практично вільна від" Y, може бути повністю вільна від Y. За необхідності слово "практично" може бути пропущене у визначенні, представленому у винаході.

Поняття "приблизно" щодо чисельного значення x означає $x \pm 10\%$, наприклад, $x \pm 5\%$, або $x \pm 7\%$, або $x \pm 10\%$, або $x \pm 12\%$, або $x \pm 15\%$, або $x \pm 20\%$.

Мається на увазі, що поняття "захворювання", яке застосовується в даному описі, має загальноприйняті синоніми і його можна використовувати як взаємозамінне з поняттями "порушення" та "стан" (як медичний стан), оскільки всі вони позначають аномальний стан організму тварини або людини або однієї з його частин, який погіршує нормальне функціонування, що, як правило, проявляється у вигляді різних ознак та симптомів і призводить до зниженої тривалості життя або погіршення якості життя людини або тварини.

У контексті даного опису мають на увазі, що "лікування" індивідуума або пацієнта включає попередження, профілактику, ослаблення, полегшення симптомів і терапію. Поняття "індивідуум" або "пацієнт" в даному описі використовують як взаємозамінні для позначення всіх ссавців, включаючи людину. Приклади індивідуумів включають людину, велику рогату худобу, собак, кішок, коней, овець, свиней і кроликів. У деяких варіантах здійснення винаходу пацієнт являє собою людину.

Дози часто виражають відповідно до маси тіла. Так, доза, виражена у вигляді [г, мг або інша одиниця] / кг (або

г, мг і т.д.), як правило, стосується [г, мг або інша одиниця] "на кг (або г, мг і т.д.) маси тіла", навіть, якщо поняття "маса тіла" спеціально не згадується.

Поняття "специфічне зв'язування" та аналогічні поняття не включають неспецифічне прилипання.

У контексті даного опису поняття "антитіло" охоплює різні форми антитіл, включаючи (але не обмежуючись тільки ними) повні антитіла, фрагменти антитіл, людські антитіла, химерні антитіла, гуманізовані антитіла, рекомбінантні антитіла і генетично сконструйовані антитіла (варіанти антитіл або мутантні антитіла), якщо вони зберігають характерні властивості, запропоновані у винаході. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло являє собою людське антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло являє собою моноклональне антитіло. Наприклад, антитіло являє собою людське моноклональне антитіло.

Людські антитіла добре відомі в даній галузі (van Dijk M. A. та van de Winkel J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс. 368-374). Людські антитіла можна одержувати також у трансгенних тварин (наприклад, миші), які можуть після імунізації продукувати повний спектр або відібрані людські антитіла за відсутності ендogenous виробництва імуноглобулінів. Перенесення масиву генів імуноглобулінів людської зародкової лінії у зазначену зародкову мутантну мишачу лінію може призводити до виробництва людських антитіл після контрольного зараження антигеном (див., наприклад, Jakobovits A. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 2551-2555; Jakobovits A. та ін., Nature, 362, 1993, сс. 255-258; Bruggemann M. та ін., Year Immunol. 7, 1993, с. 3340). Людські антитіла можна одержувати також у фагових дисплейних бібліотеках (Hoogenboom H. R. и Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388; Marks J. D. та ін., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597). Для одержання людських моноклональних антитіл можна застосовувати також методики, описані у Cole зі співавторами та Boerner зі співавторами (Cole та ін., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, вид-во Alan R. Liss, 1985, с. 77 та Boerner P. та ін., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). У деяких варіантах здійснення винаходу людські моноклональні антитіла можна одержувати за допомогою вдосконаленої іморталізації клітин EBV-B відповідно до методу, описаного у Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova 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, сс. 871-875. У контексті даного опису поняття "варіабельна ділянка" (варіабельна ділянка легкого ланцюга (V_L) і варіабельна ділянка важкого ланцюга (V_H)) означає кожен з пари легких і важких ланцюгів, що безпосередньо бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном.

Антитіла, запропоновані у винаході, можуть стосуватися будь-якого ізотипу (наприклад, IgA, IgG, IgM тобто важкий α-, γ- або μ-ланцюг). Наприклад, антитіло стосується IgG-типу. Антитіла IgG-ізотипу можуть стосуватися підкласу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4, наприклад, IgG1. Антитіла, запропоновані у винаході, можуть мати легкий κ- або λ-ланцюг. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло стосується IgG1-типу і має легкий κ-ланцюг.

Антитіла, запропоновані в даному винаході, можна одержувати в очищеній формі. Як правило, антитіло може бути присутнім в композиції, яка практично вільна від інших поліпептидів, наприклад, на частку інших поліпептидів припадає менше ніж 90 мас. %, як правило, менше ніж 60 % і найкраще менше 50 % композиції.

Антитіла, запропоновані в даному винаході, можуть мати імуногенність в організмі людини-хазяїна та/або тварин-хазяїнів крім людини (або гетерологічних хазяїнів), наприклад, в організмі мишей. Наприклад, антитіла можуть мати ідіотип, імуногенний в організмі тварин-хазяїнів крім людини, але не в організмі людини-хазяїна. Антитіла, запропоновані у винаході, призначені для застосування на людях, включають антитіла, які не можна легко виділяти з таких хазяїнів, як миші, кози, кролі, щурі, примати крім людини і т.д., і які, як правило, не можна одержувати шляхом гуманізації або з мишей після ксенотрансплантації (модель xeno-mice).

У контексті даного опису "нейтралізуюче антитіло" являє собою антитіло, яке може нейтралізувати, тобто попереджати, інгібувати, знижувати, ускладнювати або впливати на здатність патогену ініціювати та/або підтримувати інфекцію у хазяїна. Поняття "нейтралізуюче антитіло" та "антитіло, яке нейтралізує" або "антитіла, які нейтралізують" застосовують в даному описі як взаємозамінні. Зазначені антитіла можна застосовувати індивідуально або у комбінації у вигляді профілактичних або терапевтичних агентів після одержання відповідної препаративної форми, в поєднанні з активною вакцинацією, як діагностичний інструмент або як інструмент для виробництва відповідно до зазначеного в даному описі.

У контексті даного опису поняття "мутація" стосується зміни в нуклеотидній послідовності та/або в амінокислотній послідовності в порівнянні з референс-послідовністю, наприклад, відповідною геномною послідовністю. Мутація, наприклад, у порівнянні з геномною послідовністю, може являти собою, наприклад, (таку, що зустрічається в природних умовах) соматичну мутацію, спонтанну мутацію, індуковану мутацію, наприклад, мутацію, індуковану ферментами, хімічними речовинами або радіацією, або мутацію, одержану за допомогою сайтнаправленого мутагенезу (методи молекулярної біології для одержання специфічних і умисних змін до нуклеотидної послідовності та/або в амінокислотній послідовності). Таким чином, слід розуміти, що поняття "мутація" або "мутувати" включають також створену фізичним шляхом мутацію, наприклад, в нуклеотидній послідовності або амінокислотній послідовності. Мутація включає заміну, делецію та інсерцію одного або декількох нуклеотидів або однієї або декількох амінокислот, а також інверсію декількох послідовних нуклеотидів або амінокислот. Для створення мутації в амінокислотній послідовності мутацію можна інтродуціювати в нуклеотидну послідовність, що кодує зазначену амінокислотну послідовність, для експресії (рекомбінантного) мутантного поліпептиду. Мутацію можна створювати, наприклад, шляхом зміни, наприклад, за допомогою сайтнаправленого мутагенезу, кодону молекули нуклеїнової кислоти, що кодує одну амінокислоту, з одержанням кодону, що кодує іншу амінокислоту, або шляхом синтезу варіанту послідовності, наприклад, на основі знання щодо нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, і шляхом розробки синтезу молекули нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує варіант поліпептиду, без

необхідності в здійсненні мутації одного або декількох нуклеотидів молекули нуклеїнової кислоти.

В описі даної заявки процитовано декілька документів. Кожен з документів, процитованих вище або нижче в даному описі (включаючи всі патенти, заявки на патент, наукові публікації, специфікації виробника, інструкції і т.д.), повністю включений у даний опис як посилання. Нічого з викладеного в даному описі не слід тлумачити як припущення того, що винахід не має права передувати такому розкриттю сутності в силу попереднього винаходу.

Має бути очевидно, що даний винахід не обмежується конкретними методологіями, протоколами і реагентами, зазначеними в даному описі, які можуть варіюватись. Крім того, має бути очевидно, що термінологія, яка застосовується в даному описі, не спрямована на обмеження обсягу винаходу, який може бути обмежений лише доданою формулою винаходу. Якщо не вказано інше, то всі технічні та наукові поняття, які вживаються в даному описі, мають загальноприйняті значення, відомі пересічному спеціалісту в даній галузі.

Антитіла

Винахід базується, крім інших одержаних даних, на ідентифікації антитіл, які ефективно знижують інфекцію, яка викликається вірусом грипу А, навіть при введенні у дуже низьких дозах. Крім того, у антитіл, запропонованих у винаході, виявлено подовжений час напівжиття. Не вдаючись у будь-яку теорію, при створенні даного винаходу висловлено припущення про те, що підвищена ефективність антитіла, запропонованого у даному винаході, не залежить від подовженого часу напівжиття. Наприклад, щодо антитіла, яке застосовується для порівняння, антитіло, запропоноване у винаході, має підвищену ефективність, незважаючи на подібні концентрації антитіла в плазмі. Крім того, несподівано було встановлено, що антитіла, запропоновані у даному винаході, мають знижену імуногенність у порівнянні з батьківськими антитілами без мутацій M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга.

Першим об'єктом даного винаходу є (виділене) антитіло, яке містить послідовності CDR1, CDR2 й CDR3 важкого ланцюга, представлені у SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 й SEQ ID NO: 3 відповідно; послідовності CDR1, CDR2 й CDR3 легкого ланцюга, представлені у SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 й SEQ ID NO: 6 відповідно; та мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга.

Загалом, антитіло, запропоноване у даному винаході, як правило, містить (принаймні) три ділянки, які визначають комплементарність (CDR) на важкому ланцюгу та (принаймні) три CDR на легкому ланцюгу. Загалом, ділянки, які визначають комплементарність (CDR) являють собою гіперваріабельні ділянки, присутні у варіабельних доменах важких ланцюгів та варіабельних доменах легких ланцюгів. Як правило, CDR важкого ланцюга та зв'язаного з ним легкого ланцюга антитіла разом утворюють антигенний рецептор. Як правило, три CDR (CDR1, CDR2 та CDR3) не послідовно розташовані у варіабельному домені. Оскільки антигенні рецептори, як правило, складаються з двох варіабельних доменів (на двох різних поліпептидних ланцюгах, тобто на важкому та легкому ланцюгах), то у кожному антигенному рецепторі присутні шість CDR (важкий ланцюг: CDRH1, CDRH2 і CDRH3; легкий ланцюг: CDRL1, CDRL2 та CDRL3). Класична окрема молекула антитіла має два антигенні рецептори та, отже, містить дванадцять CDR. CDR на важкому та/або легкому ланцюгу можуть розділятися каркасними ділянками, де каркасна ділянка (FR) являє собою ділянку у варіабельному домені, менш "варіабельну" порівняно з CDR. Наприклад, ланцюг (або кожен ланцюг відповідно) може складатися з чотирьох каркасних ділянок, розділених трьома CDR.

Були визначені послідовності важких та легких ланцюгів наведених як приклад антитіл, запропонованих у винаході, які містили три різні CDR на важкому ланцюгу та три різні CDR на легкому ланцюгу. Положення амінокислот CDR визначали відповідно до системи нумерації IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc, M.-P. та ін. *Nucleic Acids Res.* 37, 2009, D1006-D1012).

Як правило, антитіло, запропоноване у винаході, зв'язується з гемаглютиніном вірусу грипу А. Таким чином, антитіло, запропоноване у винаході, може нейтралізувати інфекцію, яка викликається вірусом грипу А. Завдяки шести зазначеним вище послідовностям CDR, антитіло, запропоноване у даному винаході, зв'язується з тим же епітопом стовбурової ділянки гемаглютиніну вірусу грипу А (IAV HA), що й антитіло MEDI8852 (Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J. та ін. *Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes*. *Cell*, 166(3), 2016, сс. 596-608), забезпечуючи тим самим настільки ж широкий захист проти різних серотипів вірусу грипу А всіх підтипів вірусу грипу А.

Крім того, антитіло, запропоноване у даному винаході, включає дві мутації у константній ділянці важкого ланцюга (у CH3-ділянці): M428L й N434S. У цьому контексті амінокислотні положення нумерували відповідно до прийнятої в даній галузі системи EU-нумерації. Поняття "EU-індекс" або "EU-індекс відповідно до Кебота", або "EU-нумерація" стосуються EU-нумерації антитіл (Edelman G.M., Cunningham 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 U S A*, 63(1), 1969, сс. 78-85; Kabat E.A., *National Institutes of Health (U.S.) Office of the Director, Sequences Proteins of Immunological Interest*, 5-е вид., Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991, публікація повністю включена в даний опис як посилання).

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, нейтралізує інфекцію, яка викликається вірусом грипу А, у дозі, яка не перевищує половину дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні антитіла, яке застосовується для порівняння, яке відрізняється від зазначеного антитіла тільки тим, що не містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї третьої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї четвертої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для

порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї п'ятої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї шостої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї сьомої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї восьмої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї дев'ятої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. У деяких варіантах здійснення винаходу доза антитіла, запропонованого у винаході, не перевищує однієї десятої дози, необхідної для нейтралізації вірусу грипу А при використанні зазначеного антитіла, яке застосовується для порівняння. Очевидно, що для зазначених порівняльних тестів застосовують аналізи нейтралізації, які можна порівняти (подібні аналізи тестів, умови тестів тощо). Наприклад, один і той же тест (який відрізняється тільки антитілами, які підлягають тестуванню) можна застосовувати для визначення дози антитіла, запропонованого у винаході, яка потрібна для нейтралізації вірусу грипу А, та для визначення дози антитіла, яке застосовується для порівняння, яка потрібна для нейтралізації вірусу грипу А.

Для вивчення та кількісної оцінки інфекційності вірусу (або "нейтралізації") у лабораторних умовах спеціалісту в даній галузі відомі різні стандартні "аналізи нейтралізації". Для здійснення аналізу нейтралізації, як правило, віруси тварин розмножують у клітинах та/або лініях клітин. Наприклад, при здійсненні аналізу нейтралізації клітини, які культивуються, можна інкубувати з фіксованою кількістю вірусу грипу А (IAV) у присутності антитіла, яке підлягає тестуванню (або без нього). Для зчитування даних можна застосовувати, наприклад, проточну цитометрію. Альтернативно цьому можна застосовувати також інші методи зчитування даних.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло нейтралізує віруси, які кодують поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N та/або HA2 N49T гемаглютиніну (штаму) H3N2 (H3 HA); та/або поліморфізм N146D гемаглютиніну (штаму) H1N1 (H1 HA). Наприклад, антитіло може нейтралізувати один або два поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N або HA2 N49T штаму H3 HA. Зокрема, антитіло може нейтралізувати всі три поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N й HA2 N49T штаму H3 HA. Крім того, антитіло може нейтралізувати поліморфізм N146D штаму H1 HA. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло нейтралізує поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N й HA2 N49T штаму H3 HA; та поліморфізм N146D штаму H1 HA. Щодо зазначених поліморфізмів еталоном для H1N1 є A/California/07/2009, а еталоном для H3N2 є A/Perth/16/2009.

У деяких випадках антитіло нейтралізує поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N та/або HA2 N49T штаму H3 HA; та/або поліморфізм N146D штаму H1 HA, при цьому кратність змін IC_{50} становить < 2 порівняно з HA вірусом дикого типу, зокрема, при здійсненні паралельного порівняння з вірусом дикого типу. Наприклад, антитіло може нейтралізувати один або два поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N або HA2 N49T штаму H3 HA, при цьому кратність змін IC_{50} становить < 2 порівняно з HA вірусом дикого типу, зокрема, при здійсненні паралельного порівняння з вірусом дикого типу. Зокрема, антитіло може нейтралізувати всі три поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N й HA2 N49T штаму H3 HA, при цьому кратність змін IC_{50} становить < 2 порівняно з HA вірусом дикого типу, зокрема, при здійсненні паралельного порівняння з вірусом дикого типу. Крім того, антитіло може нейтралізувати поліморфізм N146D штаму H1 HA, при цьому кратність змін IC_{50} становить < 2 в порівнянні з HA вірусом дикого типу, зокрема, при здійсненні паралельного порівняння з вірусом дикого типу. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло нейтралізує поліморфізми HA1 P11S, HA2 D46N й HA2 N49T штаму H3 HA; та поліморфізм N146D штаму H1 HA, при цьому в кожному випадку кратність змін IC_{50} становить < 2 в порівнянні з HA вірусом дикого типу, зокрема, при здійсненні паралельного порівняння з вірусом дикого типу. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло викликає знижену відповідь у вигляді антитіл до лікарського препарату (ADA) щодо антитіла, яке застосовується для порівняння, яке відрізняється від зазначеного антитіла тільки тим, що не містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга. Зокрема, антитіло може мати меншу імуногенність щодо антитіла, яке застосовується для порівняння, яке відрізняється від зазначеного антитіла тільки тим, що не містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга. Як продемонстровано в прикладах, представлених у даному описі, при створенні антитіла несподівано було встановлено, що антитіло, запропоноване у винаході, викликає знижену відповідь у вигляді антитіл до лікарського препарату (ADA) та в результаті має меншу імуногенність в порівнянні з антитілом без мутацій M428L/N434S. Спеціалісту в даній галузі відомі тести, придатні для оцінки відповідей у вигляді антитіл до лікарського препарату (ADA)/імуногенності. Будь-який із зазначених тестів можна вибирати так, щоб можна було тестувати антитіло, запропоноване у винаході, та антитіло, яке застосовується для порівняння без мутацій M428L/N434S паралельно для здійснення безпосереднього порівняння. Приклади тестів представлені в прикладах 9 та 10 у даному описі.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, являє собою людське антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, являє собою моноклональне антитіло. Наприклад, антитіло, запропоноване у винаході, являє собою людське моноклональне антитіло.

Антитіла, запропоновані у винаході, можуть стосуватися будь-якого ізотипу (наприклад, IgA, IgG, IgM, тобто мати важкий α -, γ - або μ -ланцюг). Наприклад, антитіло може стосуватися IgG-типу. В межах IgG-ізотипу антитіла можуть стосуватися підкласу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4, наприклад, IgG1. Антитіла, запропоновані у винаході, можуть мати легкий κ - або λ -ланцюг. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло має легкий каппа-ланцюг.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло стосується IgG1-типу та має легкий каппа-ланцюг.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло стосується людського IgG1-типу. Антитіло може мати будь-який алотип. Поняття "алотип" стосується алейної варіації, характерної для IgG-підкласів. Наприклад, антитіло може стосуватися алотипу G1m1 (або G1m(a)), алотипу G1m2 (або G1m(x)), алотипу G1m3 (або G1m(f)), та/або алотипу G1m17 (або Gm(z)). Алотипи G1m3 й G1m17 локалізовані в одному положенні в CH1-домені (положення 214 згідно з EU-нумерацією). G1m3 відповідає R214 (EU), а G1m17 відповідає K214 (EU). Алотип G1m1 локалізований у CH3-домені (у положеннях 356 та 358 (EU)) та відповідає замінам E356D та M358L. Алотип G1m2 стосується заміни аланіну у положенні 431 (EU) на гліцин. Алотип G1m1 може бути поєднаний, наприклад, з алотипом G1m3 або G1m17. В деяких варіантах здійснення винаходу антитіло стосується алотипу G1m3 без G1m1 (G1m3-1). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло має алотип G1m17,1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло має алотип G1m3,1. В деяких варіантах здійснення винаходу антитіло стосується алотипу G1m17 без G1m1 (G1m17,-1). Необов'язково вказані алотипи можуть бути поєднані (або не поєднані) з алотипом G1m2, G1m27 або G1m28. Наприклад, антитіло може мати алотип G1m17,1,2.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 7, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 8, у яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності (послідовності CDR1, CDR2 й CDR3 важкого ланцюга, які представлені в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 й SEQ ID NO: 3 відповідно; та послідовності CDR1, CDR2 й CDR3 легкого ланцюга, які представлені в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 й SEQ ID NO: 6, відповідно).

Ідентичність послідовностей, як правило, розраховують щодо всієї довжини референс-послідовності (тобто послідовності, зазначеної у заявці). У контексті даного опису відсоток ідентичності можна визначати, наприклад, за допомогою BLAST, використовуючи параметри, які задаються за замовчуванням, запропоновані NCBI (Національний центр біотехнологічної інформації; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [матриця Blosum 62; штраф за відкриття пролomu = 11 та штраф за подовження пролomu = 1].

"Варіант послідовності" має змінену послідовність, в якій одна амінокислота або декілька амінокислот в референс-послідовності видалена(i) або замінена(i), та/або одна амінокислота або декілька амінокислот вбудована(i) в послідовність амінокислотної референс-послідовності. В результаті змін варіант амінокислотної послідовності має амінокислотну послідовність, яка принаймні на 70 % ідентична референс-послідовності. Варіант послідовності, ідентичний принаймні на 70 %, має не більше 30 змін, тобто, будь-яку комбінацію делецій, інсерцій або замін на 100 амінокислот референс-послідовності.

Загалом, хоча можуть мати місце неконсервативні амінокислотні заміни, заміни, як правило, являють собою консервативні амінокислотні заміни, при яких амінокислота, яка застосовується для заміни, має подібні структурні або хімічні властивості з відповідною амінокислотою в референс-послідовності. Наприклад, консервативні амінокислотні заміни включають заміну однієї з аліфатичних або гідрофобних амінокислот, наприклад, аланіну, й валіну, лейцину та ізолейцину, на іншу; заміну однієї з амінокислот, які містять гідроксил, наприклад, серину і треоніну, на іншу; заміну одного з кислих залишків, наприклад, глютамінової кислоти або аспарагінової кислоти, на інший; заміну одного залишку, що містить амід, наприклад, аспарагіну і глютаміну, на інший; заміну одного ароматичного залишку, наприклад, фенілаланіну та тирозину, на інший; заміну одного основного залишку, наприклад, лізину, аргініну та гістидину, на інший; й заміну однієї з низькомолекулярних амінокислот, наприклад, аланіну, серину, треоніну, метіоніну та гліцину, на іншу. Інсерції в амінокислотну послідовність включають аміно- та/або карбоксикінцеві злиття, які мають довжину від одного залишку до поліпептидів, які містять сто або більше залишків, а також інсерції всередину послідовності одного або декількох амінокислотних залишків. Приклади кінцевих інсерцій включають злиття з N- або C-кінцем амінокислотної послідовності репортерної молекули або ферменту.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність, ідентичну на 75 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 7, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну принаймні на 75 % SEQ ID NO: 8, у яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну на 80 % або більше (тобто на 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше) SEQ ID NO: 7, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну принаймні на 80 % SEQ ID NO: 8, в яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну на 85 % або більше (тобто на 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше) SEQ ID NO: 7, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну принаймні на 85 % SEQ ID NO: 8, в яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну

послідовність, ідентичну на 90 % або більше (тобто на 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше) SEQ ID NO: 7, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну принаймні на 90 % SEQ ID NO: 8, в яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну на 95 % або більше (тобто на 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше) SEQ ID NO: 7, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну принаймні на 95 % SEQ ID NO: 8, в яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності.

В деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8, в яких зберігаються зазначені вище CDR-послідовності.

Загалом антитіло, запропоноване у винаході, може містити одну або декілька додаткових мутацій (крім M428L і N434S) у Fc-ділянці (наприклад, у CH2- або CH3-ділянці). Однак у деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, не містить будь-якої додаткової мутації, крім M428L й N434S в його CH3-ділянці (порівняно з відповідною CH3-ділянкою дикого типу). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, не містить будь-якої додаткової мутації крім M428L і N434S в його Fc-ділянці (у порівнянні з відповідною Fc-ділянкою дикого типу). У контексті даного опису поняття "дикий тип" стосується референс-послідовності, наприклад, такої, яка зустрічається в природних умовах. Як конкретний приклад поняття "дикий тип" може стосуватися послідовності, яка найчастіше зустрічається в природних умовах. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, та легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10. Наприклад, антитіло, запропоноване у винаході, може мати важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 9, та легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 10.

Антитіла, запропоновані у винаході, включають також гібридні молекули антитіл, які містять шість CDR з антитіла, запропонованого у винаході, яке описане вище, і одну або декілька CDR з іншого антитіла до такого ж або іншого епітопу або антигену. У деяких варіантах здійснення винаходу зазначені гібридні антитіла містять шість CDR з антитіла, запропонованого у винаході, і шість CDR з іншого антитіла до іншого епітопу або антигену.

Під обсяг даного винаходу також підпадають варіанти антитіл. Таким чином, під обсяг даного винаходу підпадають також і варіанти послідовностей, зазначених у даній заявці. Зазначені варіанти включають варіанти, які зустрічаються в природних умовах, що утворилися в результаті соматичної мутації *in vivo* у процесі імунної відповіді або *in vitro* при культивуванні іморталізованих клонів В-клітин. Альтернативно цьому варіанти можуть виникати в результаті виродженості генетичного коду або внаслідок помилок при транскрипції або трансляції.

Антитіла, запропоновані у винаході, можна одержувати в очищеній формі. Як правило, антитіло має бути присутнім у композиції, практично вільній від інших поліпептидів, наприклад, де менше 90 % (мас. %), як правило, менше 60 % і більш краще менше 50 % композиції припадає на частку інших поліпептидів.

Антитіла, запропоновані у винаході, можуть бути імуногенними для хазяїнів, крім людини (або гетерологічних хазяїнів), наприклад, мишей. Зокрема, антитіла можуть мати ідіотип, імуногенний для хазяїнів, крім людини, але не для людини-хазяїна. Зокрема, антитіла, запропоновані у винаході, призначені для застосування на людині, включають антитіла, які не можна легко виділяти з таких хазяїнів, як миші, кози, кролики, ссавці крім приматів і т.д. і які, як правило, не можна одержати шляхом гуманізації або з мишей після ксенотрансплантації (модель хено-mice).

Нуклеїнові кислоти

Інший об'єкт винаходу являє собою також молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить полінуклеотид, який кодує вказане вище антитіло, запропоноване у даному винаході.

В деяких варіантах здійснення винаходу молекула нуклеїнової кислоти містить

(I) полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 12, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності; та

(II) полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 13, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності.

В деяких варіантах здійснення винаходу молекула нуклеїнової кислоти містить

(I) полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 14; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 14, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності, та мутації M428L й N434S в константній ділянці; та

(II) полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 15, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності.

98 %, 99 % або більше) SEQ ID NO: 15, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності, та мутації M428L й N434S у константній ділянці.

Приклади молекул нуклеїнових кислот та/або полінуклеотидів включають, наприклад, рекомбінантний полінуклеотид, вектор, олігонуклеотид, молекулу РНК, таку як рРНК, мРНК, міРНК, сіРНК або тРНК, або молекулу ДНК, таку як кДНК. Нуклеїнові кислоти можуть кодувати легкий ланцюг та/або важкий ланцюг антитіла, запропонованого у винаході. Іншими словами, легкий ланцюг та важкий ланцюг антитіла можуть кодуватися однією й тією ж молекулою нуклеїнової кислоти (наприклад, біцистронно). Альтернативно, легкий ланцюг та важкий ланцюг антитіла можуть кодуватися різними молекулами нуклеїнових кислот.

З урахуванням надмірності генетичного коду даний винахід включає варіанти послідовностей нуклеотидних послідовностей, які кодують одні й ті ж амінокислотні послідовності. Полінуклеотид, який кодує антитіло (або повну молекулу нуклеїнової кислоти), можна оптимізувати для експресії антитіла. Наприклад, оптимізацію кодонів нуклеотидної послідовності можна застосовувати для підвищення ефективності трансляції в експресійних системах, призначених для одержання антитіла. Наведені як приклад нуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 12, 13, 14 і 15 являють собою послідовності з оптимізованими кодонами, призначені для експресії наведеного як приклад антитіла FluAB_MLNS. Крім того, молекула нуклеїнової кислоти може містити гетерологічні елементи (тобто елементи, які в природних умовах не зустрічаються в тій самій молекулі нуклеїнової кислоти, що і кодує послідовність (важкого або легкого ланцюга) антитіла. Наприклад, молекула нуклеїнової кислоти може містити гетерологічний промотор, гетерологічний енхансер, гетерологічну UTR (наприклад, для оптимальної трансляції/експресії), гетерологічний полі-А-хвіст і т.д.

Молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу, яка містить компоненти нуклеїнової кислоти. Поняття "молекула нуклеїнової кислоти", як правило, стосується молекул ДНК або РНК. Його можна використовувати як синонім до поняття "полінуклеотид", тобто молекула нуклеїнової кислоти може складатися з полінуклеотиду, який кодує антитіло. Альтернативно, молекула нуклеїнової кислоти може містити також додаткові елементи крім полінуклеотиду, який кодує антитіло. Як правило, молекула нуклеїнової кислоти являє собою полімер, який містить або складається з нуклеотидних мономерів, які ковалентно пов'язані один з одним за допомогою фосфодієфірних зв'язків цукрово/фосфатного каркасу. Поняття "молекула нуклеїнової кислоти" включає також модифіковані молекули нуклеїнових кислот, такі як молекули ДНК або РНК з модифікованими основами, модифікованими цукрами або модифікованим каркасом і т.д.

Загалом молекулу нуклеїнової кислоти можна піддавати маніпуляціям, вбудовуючи, вилучаючи шляхом делеції або змінюючи деякі нуклеотидні послідовності. Зміни в результаті зазначеної маніпуляції включають (але, не обмежуючись тільки ними) зміни для інтродукції сайтів рестрикції, для корекції переваги кодонів, для додавання або оптимізації транскрипції та/або трансляції регуляторних послідовностей і т.д. Можна також змінювати нуклеїнову кислоту для зміни амінокислот, які кодуються. Наприклад, може виявитися цінним інтродукувати одну або декілька (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 і т.д.) амінокислотних замін, делецій та/або інсерцій в амінокислотну послідовність антитіла. Зазначені точкові мутації можуть модифікувати ефекторні функції, афінність зв'язування антигену, посттрансляційні модифікації, імуногенність і т.д., можна інтродукувати амінокислоти для приєднання ковалентних груп (наприклад, міток) або можна інтродукувати мітки (наприклад, для цілей очищення. Альтернативно цьому, мутація нуклеотидної послідовності може бути "тихою", тобто, не виявлятися в амінокислотній послідовності через надмірність генетичного коду. Загалом, мутації можна інтродукувати в конкретні сайти або можна інтродукувати випадково з наступною селекцією (наприклад, молекулярна еволюція). Наприклад, одну або декілька нуклеїнових кислот, які кодують будь-які легкі або важкі ланцюги (наведеного як приклад) антитіла, можна піддавати випадковій або спрямованій мутації для додання різних властивостей амінокислотам, які кодуються. Зазначені зміни можуть призводити до ітераційного процесу, за якого початкові зміни можуть зберігатися, а нові зміни інтродукуватися в інших нуклеотидних положеннях. Крім того, можна поєднувати зміни, одержані на незалежних стадіях.

У деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотид, який кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент (або (повна) молекула нуклеїнової кислоти) може мати оптимізовані кодони. Спеціалісту в даній галузі відомі різні інструменти для оптимізації кодонів, наприклад, описані 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, випуск 15, 1 августа 2014 г., сс. 2210–2212; або 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 липня 2005 г. 33 (видання Web Server):W526-31; або, наприклад, представлені в алгоритмі OptimumGene™ фірми Genscript (описаний в US 2011/0081708 A1).

У даному винаході запропонована також комбінація першої та другої молекул нуклеїнових кислот, в якій перша молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотид, який кодує важкий ланцюг антитіла, запропонованого у даному винаході; а друга молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотид, який кодує відповідний легкий ланцюг того ж антитіла. Вказаний вище опис, який стосується (основних) особливостей молекули нуклеїнової кислоти, запропонованої у винаході, може бути застосований відповідно до першої та другої молекул нуклеїнових кислот, які входять до комбінації. Таким чином, один або обидва полінуклеотиди, який/які кодує(ють) важкий(і) та/або легкий(і) ланцюг(и) антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, являють собою полінуклеотид(и) з оптимізованими кодонами.

У деяких варіантах здійснення винаходу комбінація молекул нуклеїнових кислот містить

(I) першу молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить полінуклеотид, який кодує важкий ланцюг антитіла, полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12; або нуклеотидну

послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 12, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності; та

(II) другу молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить полінуклеотид, який кодує легкий ланцюг антитіла, полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 13, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності.

У деяких варіантах здійснення винаходу комбінація молекул нуклеїнових кислот містить

(I) першу молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить полінуклеотид, який кодує важкий ланцюг антитіла, полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 14; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 14, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності та мутації M428L та N434S у константній ділянці; та

(II) другу молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить полінуклеотид, який кодує легкий ланцюг антитіла, полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15; або нуклеотидну послідовність, ідентичну на 70 % або більше (тобто 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 % або більше) SEQ ID NO: 15, нуклеотидну послідовність, яка кодує зазначені вище CDR-послідовності та мутації M428L та N434S у константній ділянці.

Вектор

Під обсяг винаходу підпадають також вектори, наприклад, експресійні вектори, які містять молекулу нуклеїнової кислоти, запропоновану у даному винаході, або комбінацію молекул нуклеїнових кислот, запропоновану у даному винаході (наприклад, у біцистронному форматі). Як правило, вектор містить молекулу нуклеїнової кислоти, описану вище, або комбінацію молекул нуклеїнових кислот, описану вище (наприклад, у біцистронному форматі).

У даному винаході запропонована також комбінація першого та другого векторів, в якій перший вектор містить першу молекулу нуклеїнової кислоти, описану вище (для комбінації молекул нуклеїнових кислот), а другий вектор містить другу молекулу нуклеїнової кислоти, описану вище (для комбінації молекул нуклеїнових кислот).

Вектор, як правило, являє собою рекомбінантну молекулу нуклеїнової кислоти, тобто, молекулу нуклеїнової кислоти, яка не зустрічається у природних умовах. Таким чином, вектор може містити гетерологічні елементи (тобто елементи послідовності, які відрізняються від таких, які зустрічаються у природі). Наприклад, вектор може містити сайт множинного клонування, гетерологічний промотор, гетерологічний енхансер, гетерологічний маркер селекції (для ідентифікації клітин, які містять зазначений вектор, порівняно з клітинами, які не містять зазначений вектор) і т.п. Вектор у контексті даного винаходу можна застосовувати для включення або експресії необхідної нуклеотидної послідовності. Зазначені вектори можуть являти собою вектори для зберігання, експресійні вектори, вектори, які клонують, вектори для перенесення і т.д. Вектор для зберігання являє собою вектор, який забезпечує зручне зберігання молекули нуклеїнової кислоти. Так, вектор може містити послідовність, яка відповідає, наприклад (важкого та/або легкого ланцюга) необхідному антитілу, запропонованому у даному винаході. Експресійний вектор можна застосовувати для одержання продуктів експресії, таких як РНК, наприклад, мРНК, або пептидів, поліпептидів або білків. Наприклад, експресійний вектор може містити послідовності, необхідні для транскрипції сегмента послідовності вектору, такого як (гетерологічна) промоторна послідовність. Вектор, який клонує, як правило, являє собою вектор, який містить сайт клонування, який можна застосовувати для включення нуклеотидних послідовностей у вектор. Вектор, який клонує, може являти собою, наприклад, плазмідний вектор або вектор на основі бактеріофага. Вектор для перенесення може являти собою вектор, який можна застосовувати для перенесення молекул нуклеїнових кислот у клітини або організми, наприклад, вірусні вектори. Вектор у контексті даного винаходу може являти собою, наприклад, РНК-вектор або ДНК-вектор. Наприклад, вектор у контексті даного винаходу містить сайт клонування, маркер для селекції, такий як фактор стійкості до антибіотиків, та послідовність, яку можна застосовувати для розмноження вектору, таку як сайт ініціації реплікації. Вектор у контексті даного опису може являти собою плазмідний вектор.

Клітини

Наступним об'єктом даного винаходу є також клітина, яка експресує антитіло, запропоноване у даному винаході; та/або яка містить вектор, запропонований у даному винаході.

Приклади таких клітин включають (але, не обмежуючись лише ними) еукаріотичні клітини, наприклад, клітини дріжджів, клітини тварин або клітини рослин, або прокаріотичні клітини, наприклад, *E. coli*. У деяких варіантах здійснення винаходу клітини являють собою клітини ссавців, наприклад, лінію клітин ссавців. Приклади включають людські клітини, CHO-клітини, HEK293T-клітини, PER.C6-клітини, NS0-клітини, клітини печінки людини, клітини мієломи або клітини гібридами.

Клітину можна трансфектувати вектором, запропонованим у даному винаході, наприклад експресійним вектором. Поняття "трансфекція" стосується інтродукції молекул нуклеїнових кислот, таких як молекули ДНК або РНК (наприклад, мРНК), в клітини, наприклад, в еукаріотичні або прокаріотичні клітини. У контексті даного винаходу поняття "трансфекція" включає будь-який відомий спеціалісту в даній галузі метод інтродукції молекул

нуклеїнових кислот у клітини, такі як клітини ссавців. Такі методи включають, наприклад, електропорацію, ліпофекцію, наприклад, на основі катіонних ліпідів та/або ліпосом, осадження фосфатом кальцію, трансфекцію на основі наночастинок, трансфекцію на основі вірусів або трансфекцію на основі катіонних полімерів, таких як ДЕАЕ-декстран або поліетиленімін і т.д. У деяких варіантах здійснення винаходу інтродукція є невірусною.

Крім того, клітини, запропоновані у даному винаході, можна трансфектувати стабільно або короткочасно вектором, запропонованим у даному винаході, наприклад, для експресії антитіла, запропонованого у даному винаході. У деяких варіантах здійснення винаходу клітини стабільно трансфектують вектором, запропонованим у даному винаході, який кодує антитіло, запропоноване у даному винаході. В інших варіантах здійснення винаходу клітини короткочасно трансфектують вектором, запропонованим у даному винаході, який кодує антитіло, запропоноване у даному винаході.

Таким чином, у даному винаході запропонована також рекомбінантна клітина-хазяїн, яка гетерологічно експресує антитіло, запропоноване у винаході, або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, клітина може являти собою клітину іншого виду в порівнянні з видом, який є джерелом антитіла (наприклад, CHO-клітини, які експресують людські антитіла). У деяких варіантах здійснення винаходу клітина стосується типу клітин, які не експресують (такі) антитіла у природних умовах. Крім того, клітина-хазяїн може передавати до антитіла пост-трансляційну модифікацію (PTM; наприклад, глікозилювання), яка відсутня в його природному стані. Зазначена PTM може призводити до функціональної відмінності (наприклад, зниженої імуногенності). Таким чином, антитіло, запропоноване у винаході, або його антигензв'язуючий фрагмент може мати пост-трансляційну модифікацію, яка відрізняє його від одержаного в природних умовах антитіла (наприклад, антитіла, яке утворюється при імунній відповіді у людини).

Одержання антитіл

Антитіла, запропоновані у винаході, можна одержувати будь-яким методом, відомим у даній галузі. Наприклад, добре відома загальна методологія створення моноклональних антитіл з використанням технології гібридом (Kohler G. та Milstein C., . 1975; Kozbar та ін., 1983). У деяких варіантах здійснення винаходу застосовують альтернативний метод іморталізації з використанням EBV, описаний в WO 2004/076677.

У деяких варіантах здійснення винаходу застосовують метод, описаний у заявці WO 2004/076677, яка включена в даний опис як посилання. При здійсненні цього методу В-клітини, які продукують антитіло, запропоноване у винаході, трансформують EBV та активатором поліклональних В-клітин. Необов'язково в процесі стадії трансформації можна додавати додаткові стимулятори клітинного зростання для додаткового підвищення ефективності. Ці стимулятори можуть являти собою цитокіни, такі як IL 2 та IL-15. В одному з об'єктів винаходу IL-2 додають у процесі стадії іморталізації для додаткового підвищення ефективності іморталізації, але його застосування не є необхідним. Одержані за допомогою даного методу іморталізовані В-клітини можна потім культивувати з використанням методів, відомих у даній галузі, та виділяти з них антитіла.

Інший наведений як приклад метод описаний у WO 2010/046775. При здійсненні цього методу культивують плазматичні клітини в обмеженій кількості або поодинокі плазматичні клітини в мікролункових культуральних планшетах. Антитіла можна виділяти із культур плазматичних клітин. Крім того, з культур плазматичних клітин можна екстрагувати РНК та здійснювати ПЛР з використанням відомих у даній галузі методів. VH- та VL-ділянки антитіл можна ампліфікувати за допомогою ЗТ-ПЛР (ПЛР із зворотною транскриптазою), секвенувати та клонувати в експресійному векторі, який можна потім трансфектувати у HEK293T-клітини або інші клітини-хазяїни. Клонування нуклеїнової кислоти в експресійних векторах, трансфекцію клітин-хазяїнів, культивування трансфектованих клітин-хазяїнів та виділення одержаного антитіла можна здійснювати з використанням будь-яких методів, відомих спеціалістам у даній галузі.

Антитіла можна за необхідності додатково очищати, використовуючи фільтрацію, центрифугування та різні хроматографічні методи, такі як РХВР або афінна хроматографія. Методики очищення антитіл, наприклад, моноклональних антитіл, включаючи методики одержання антитіл, які мають фармацевтичну чистоту, добре відомі в даній галузі.

Для одержання послідовностей ДНК, які кодують антитіла, запропоновані у даному винаході, можна застосовувати стандартні методи молекулярної біології. Необхідні послідовності ДНК можна синтезувати повністю або частково за допомогою методів синтезу олігонуклеотидів. За необхідності можна застосовувати методи сайтнаправленого мутагенезу та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Будь-яку прийнятну систему клітина-хазяїн/ вектор можна застосовувати для експресії послідовностей ДНК, які кодують молекули антитіл, запропоновані у даному винаході. Системи експресії на основі еукаріотичних клітин, наприклад, клітин ссавців, як клітини-хазяїни, можна застосовувати для одержання молекул антитіл, таких як молекули повних антитіл. Прийнятні клітини ссавців, які застосовуються як хазяїни, включають (але, не обмежуючись тільки ними) клітини CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, міеломи або гібридами. Крім того, можна застосовувати системи експресії на основі прокаріотичних, наприклад, бактеріальних клітин-хазяїнів для одержання молекул антитіл, таких як молекули повних антитіл. Прийнятні бактеріальні клітини-хазяїни включають (але, не обмежуючись лише ними) клітини E. coli.

У даному винаході запропонований спосіб одержання молекули антитіла, запропонованої в даному винаході, що включає культивування (гетерологічної) клітини-хазяїна, яка містить вектор, який кодує нуклеїнову кислоту, запропоновану в даному винаході, в умовах, прийнятних для експресії білка з ДНК, яка кодує молекулу антитіла, запропоновану у даному винаході, та виділення молекули антитіла.

Для одержання антитіла, яке містить і важкі і легкі ланцюги, клітинну лінію можна трансфектувати двома векторами, першим вектором, який кодує поліпептид легкого ланцюга, та другим вектором, який кодує поліпептид

важкого ланцюга. Альтернативно цьому можна використовувати один вектор, який включає послідовності, які кодують поліпептиди легкого ланцюга та важкого ланцюга.

Антитіла, запропоновані у винаході, можна одержувати шляхом (I) експресії нуклеотидної послідовності, запропонованої у винаході, у клітині-хазяїні, наприклад, з використанням вектору, запропонованого у даному винаході, та (II) виділення продукту експресії у вигляді антитіла. Додатково, метод може включати (III) очищення виділеного антитіла. Трансформовані В-клітини та культивовані плазматичні клітини можна піддавати скринінгу щодо їх здатності продукувати антитіла з необхідною специфічністю або функцією.

Стадію скринінгу можна здійснювати з використанням будь-якого імуноаналізу, наприклад, ELISA, шляхом фарбування тканин або клітин (включаючи трансфектовані клітини), шляхом аналізу нейтралізації або будь-якого з багатьох інших методів, відомих у даній галузі, призначених для ідентифікації необхідної специфічності або функції. Аналіз можна вибирати лише на основі розпізнавання одного або декількох антигенів або можна вибирати на основі додаткових вимог, які включають необхідну функцію і т.д., для відбору антитіл, які нейтралізують, а не антитіл, які просто зв'язуються з антигеном, для відбору антитіл, які можуть змінювати характеристики клітин-мішеней, такі як їх каскади передачі сигналів, їх форма, їх швидкість зростання, їх здатність впливати на інші клітини, їх відповідь на вплив інших клітин або інших реагентів або зміну умов, їх статус диференціювання і т.д.

Потім можна одержувати індивідуальні клони трансформованих В-клітин із позитивної трансформованої В-клітинної культури. Стадію клонування для відділення індивідуальних клонів із суміші позитивних клітин можна здійснювати з використанням серійного розведення, мікроманіпуляції, відбору одиначної клітини за допомогою сортиру клітин або іншого методу, відомого в даній галузі.

Нуклеїнову кислоту з культивованих плазматичних клітин можна виділяти, клонувати та експресувати в НЕК293Т-клітинах або інших відомих клітинах-хазяїнах з використанням методів, відомих у даній галузі.

Клони іморталізованих В-клітин або трансфектовані клітини-хазяїни, запропоновані у винаході, можна застосовувати різними шляхами, наприклад, як джерело моноклональних антитіл, як джерело нуклеїнової кислоти (ДНК або мРНК), що кодує моноклональне антитіло, яке представляє інтерес, для досліджень і т.д.

У винаході запропонована також композиція, яка містить іморталізовані В-клітини пам'яті або трансфектовані клітини-хазяїни, які продукують антитіла, запропоновані у даному винаході.

Клон іморталізованих В-клітин або культивовані плазматичні клітини, запропоновані у винаході, можна використовувати також як джерело нуклеїнової кислоти для клонування генів антитіл для подальшої рекомбінантної експресії. Експресія з рекомбінантних джерел може бути більш поширеною для фармацевтичних цілей порівняно з експресією з В-клітин або гібридом, наприклад, з позиції стабільності, відтворюваності, простоти культивування і т.д.

Таким чином, у даному винаході запропонований також спосіб одержання рекомбінантної клітини, яка включає стадії, на яких (I) одержують одну або декілька нуклеїнових кислот (наприклад, мРНК для важкого та/або легкого ланцюга) з клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин, яка(і) кодує(ють) антитіло, яке представляє інтерес; (II) вбудовують нуклеїнову кислоту в експресійний вектор і (III) трансфектують вектором (гетерологічну) клітину-хазяїна для забезпечення експресії антитіла, яке представляє інтерес у зазначеній клітині-хазяїні.

Аналогічно цьому, у винаході запропонований також спосіб одержання рекомбінантної клітини, яка включає стадії, на яких: (I) секвенують нуклеїнову(і) кислоту(и) з клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин, яка(і) кодує(ють) антитіло, яке представляє інтерес; і (II) використовують інформацію про послідовності, отриману на стадії (I), для одержання нуклеїнової(их) кислоти(т) для інсерції в клітину-хазяїна для забезпечення експресії антитіла, яке представляє інтерес у зазначеній клітині-хазяїні. Нуклеїнову кислоту можна, але це не є обов'язковим, піддавати маніпуляціям між стадіями (I) та (II) для інтродукції сайтів рестрикції, для зміни переваги кодонів та/або для оптимізації транскрипції та/або трансляції регуляторних послідовностей.

Крім того, у винаході запропонований також спосіб одержання трансфектованої клітини-хазяїна, який включає стадію трансфекції клітини-хазяїна однією або декількома нуклеїновими кислотами, які кодують антитіло, яке представляє інтерес, в якому нуклеїнові кислоти являють собою нуклеїнові кислоти, одержані з клону іморталізованих В-клітин або культивованої плазматичної клітини, запропонованих у винаході. Зазначені процедури початкового одержання нуклеїнової(их) кислоти(т) і подальшого їх застосування для трансфекції клітини-хазяїна можуть здійснюватися в різний час різними людьми і в різних місцях (наприклад, в різних країнах).

Потім зазначені рекомбінантні клітини, запропоновані у винаході, можна застосовувати для експресії та культивування. Вони особливо цінні для експресії антитіл при великомасштабному фармацевтичному виробництві. Їх можна застосовувати також як діючу речовину фармацевтичної композиції. Можна застосовувати будь-яку прийнятну методику культивування, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) статичне культивування, ролерне культивування у флаконах, культивування в асцитній рідині, культивування в біореакторі з картриджем з порожнистих волокон, культивування в мініферментері модульного типу, культивування в реакторі з мішалкою, культивування на мікроносіях, перфузійне культивування з використанням керамічного картриджа і т.д.

Методи одержання та секвенування генів імуноглобулінів з В-клітин або плазматичних клітин добре відомі в даній галузі (наприклад, див. главу 4 в Kuby Immunology, 4-е вид., 2000).

Трансфектована клітина-хазяїн може являти собою еукаріотичну клітину, включаючи клітини дріжджів та тварин, насамперед клітини ссавців (наприклад, CHO-клітини, NS0-клітини, людські клітини, такі як PER.C6 або НКВ 11, клітини мієломи або клітини печінки людини), а також клітини рослин. У деяких варіантах здійснення

винаходу трансфектована клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця, наприклад, клітину людини. У деяких варіантах здійснення винаходу експресія хазяїнів може призводити до глікозилювання антитіла, запропонованого у винаході, насамперед за допомогою вуглеводних структур, які самі не є імуногенними для людини. У деяких варіантах здійснення винаходу трансфектована клітина-хазяїн може рости в безсироваткових середовищах. В інших варіантах здійснення винаходу трансфектована клітина-хазяїн може рости у культурі без присутності продуктів тваринного походження. Трансфектовану клітину-хазяїна можна також культивувати з одержанням клітинної лінії.

У винаході запропонований також спосіб одержання однієї або декількох молекул нуклеїнових кислот (наприклад, генів важких і легких ланцюгів), які кодують антитіло, яке представляє інтерес, що включає стадії, на яких: (I) одержують клон іморталізованих В-клітин або культивують плазматичні клітини, запропоновані в винаході; (II) одержують із клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло, яке представляє інтерес. Крім того, у винаході запропонований спосіб одержання нуклеотидної послідовності, яка кодує антитіло, яке представляє інтерес, що включає стадії, на яких: (I) одержують клон іморталізованих В-клітин або культивують плазматичні клітини, запропоновані у винаході; (II) секвенують одержану з клону іморталізованих В-клітин або культивованих плазматичних клітин нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, яке представляє інтерес.

У винаході запропонований також спосіб одержання молекули(л) нуклеїнової(их) кислоти(т), яка(і) кодує(ють) антитіло, яке представляє інтерес, що включає стадію одержання нуклеїнової кислоти, яка походить з клону трансфектованих В-клітин або культивованих плазматичних клітин, запропонованих у винаході. При цьому процедури початкового одержання клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин і подальшого одержання нуклеїнової(их) кислоти(т) з клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин можуть здійснюватися в різний час різними людьми і в різних місцях (наприклад, в різних країнах).

Винахід стосується також способу одержання антитіла (наприклад, для фармацевтичного застосування), запропонованого у даному винаході, який включає стадії, на яких: (I) одержують і/або секвенують одну або декілька нуклеїнових кислот (наприклад, гени важких і легких ланцюгів) з відібраного клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин, які експресують антитіло, яке представляє інтерес; (II) вбудовують нуклеїнову(і) кислоту(и) в експресійний вектор або застосовують нуклеотидну(і) послідовність(і) для одержання експресійного вектору; (III) трансфектують клітину-хазяїна, яка може експресувати антитіло, яке представляє інтерес; (IV) культивують або субкультивують трансфектовані клітини-хазяїни в умовах, в яких відбувається експресія антитіла, яке представляє інтерес; і необов'язково (V) очищають антитіло, яке представляє інтерес.

У винаході запропонований також спосіб одержання антитіла, яке представляє інтерес, що включає стадії, на яких: культивують або субкультивують популяцію трансфектованих клітин-хазяїнів, наприклад, популяцію стабільно трансфектованих клітин-хазяїнів, в умовах, в яких відбувається експресія антитіла, яке представляє інтерес, і необов'язково очищають антитіло, яке представляє інтерес, в якому зазначена популяція трансфектованих клітин-хазяїнів одержана шляхом (I) одержання нуклеїнової(их) кислоти(т), що кодує(ють) відібране антитіло, яке представляє інтерес, яке одержували з використанням клону В-клітин або культивованих плазматичних клітин, одержаних згідно з описаним вище методом, (II) вбудовування нуклеїнової(их) кислоти(т) в експресійний вектор, (III) трансфекції вектором клітини-хазяїна, яка може експресувати антитіло, яке представляє інтерес, і (IV) культивування або субкультивування трансфектованої клітини-хазяїна, що включає вбудовані нуклеїнові кислоти, з одержанням антитіла, яке представляє інтерес. При цьому, процедури початкового одержання рекомбінантної клітини-хазяїна та подальшого її культивування для експресії антитіла можуть здійснюватися у різний час різними людьми та в різних місцях (наприклад, у різних країнах).

У даному винаході запропонований також спосіб зниження імуногенності антитіла, яке містить послідовності CDR1, CDR2 та CDR3 важкого ланцюга, представлені у SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 та SEQ ID NO: 3 відповідно; послідовності CDR1, CDR2 та CDR3 легкого ланцюга, представлені у SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6 відповідно; спосіб включає стадію інтродукції мутацій M428L і N434S в константну ділянку важкого ланцюга антитіла. Для одержання мутацій можна використовувати описаний вище метод. Як продемонстровано в прикладах, наведених у даному описі, при створенні винаходу несподівано було встановлено, що антитіло, запропоноване у винаході, має лише дуже незначну імуногенність, зокрема меншу імуногенність у порівнянні з антитілом без мутацій M428L / N434S. Таким чином, інтродукція в антитіло зазначених мутацій знижує імуногенність антитіла.

Фармацевтична композиція

В У даному винаході запропонована також фармацевтична композиція, яка містить один або декілька наступних компонентів:

- (I) антитіло, запропоноване в даному винаході;
- (II) нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, запропоноване в даному винаході;
- (III) вектор, який містить нуклеїнову кислоту, запропоновану в даному винаході; та/або
- (IV) клітину, яка експресує антитіло, запропоноване в даному винаході, або яка містить вектор, запропонований в даному винаході,

та необов'язково, фармацевтично прийнятний розчинник або носій.

Іншими словами, у даному винаході також запропонована фармацевтична композиція, яка містить антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, та/або клітину, запропоновану у даному винаході.

Фармацевтична композиція необов'язково може містити фармацевтично прийнятний носій, розріджувач

та/або ексципієнт. Хоча носій або ексципієнт може полегшувати введення, він сам не повинен індукувати виробництво антитіл, шкідливих для індивіда, який отримує композицію. Він не повинен бути токсичним. Придатні носії можуть являти собою великі макромолекули, які повільно метаболізуються, такі як білки, поліпептиди, ліпосоми, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, співполімери амінокислот та неактивні вірусні частинки. У деяких варіантах здійснення винаходу фармацевтично прийнятний носій, розріджувач та/або ексципієнт у фармацевтичній композиції, запропонованій у даному винаході, являє собою компонент, який не має активності щодо інфекції, яка викликається вірусом грипу А.

Можна застосовувати фармацевтично прийнятні солі, наприклад, мінеральні кислотні-адитивні солі, такі як гідрохлориди, гідроброміди, фосфати та сульфати, або солі органічних кислот, такі як ацетати, пропіонати, малонати та бензоати.

Фармацевтично прийнятні носії у фармацевтичній композиції можуть додатково містити рідини, такі як вода, фізіологічний розчин, гліцерин та етанол. Крім того, у таких композиціях можуть бути присутні допоміжні субстанції, такі як змочуючі або емульгуючі агенти або рН-забуферуючі субстанції. Такі носії дозволяють одержати фармацевтичні композиції у формі таблеток, пігулок, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, кашок та суспензій для прийому внутрішньо пацієнтом.

Фармацевтичні композиції, запропоновані у винаході, можна одержати у різних формах. Наприклад, композиції можна одержати у вигляді ін'єкційних препаратів, таких як рідкі розчини або суспензії. Можна також одержати тверді форми, придатні для розчинення або суспендування в рідких наповнювачах перед ін'єкцією (наприклад, ліофілізовану композицію, аналогічну Synagis™ й Herceptin® для відновлення за допомогою стерильної води, яка містить консервант). Композицію можна одержати для місцевого застосування, наприклад у вигляді мазі, крему або порошку. Композицію можна одержати для орального введення, наприклад, у формі таблетки або капсули, у вигляді спрею або у вигляді сиропу (необов'язково ароматизованого). Композицію можна одержати для внутрішньолегового введення, наприклад, за допомогою інгалятора з використанням тонкоподрібненого порошку або спрею. Композицію можна одержати у формі супозиторію або песарію. Композицію можна одержати для назального, вушного або очного введення, наприклад, у вигляді крапель. Композиція може бути у формі набору, який розроблений таким чином, що об'єднана композиція може бути відновлена безпосередньо перед введенням індивідууму. Наприклад, ліофілізоване антитіло можна постачати в наборі зі стерильною водою або стерильним буфером.

У деяких варіантах здійснення винаходу (єдина) діюча речовина в композиції являє собою антитіло, запропоноване у даному винаході. Сама по собі, вона може бути чутливою до розщеплення у шлунково-кишковому тракті. Тому, якщо композиція призначена для введення через шлунково-кишковий тракт, композиція може містити агенти, які захищають антитіло від розщеплення, але які вивільняють антитіло при його абсорбції зі шлунково-кишкового тракту.

Детальне обговорення фармацевтично прийнятних носіїв наведено у Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20-е вид., ISBN: 0683306472.

Значення рН фармацевтичних композицій, запропонованих у винаході, зазвичай становить від 5,5 до 8,5, у деяких варіантах здійснення винаходу воно може становити від 6 до 8, наприклад, приблизно 7. Значення рН можна підтримувати за допомогою буфера. Композиція може бути стерильною та/або вільною від пірогенів. Композиція може бути ізотонічною плазмі крові людини. У деяких варіантах здійснення винаходу фармацевтичні композиції, запропоновані у винаході, поставляють у герметично запечатаних контейнерах.

Під обсяг даного винаходу підпадають композиції, які знаходяться в декількох формах, призначених для введення; зазначені форми включають (але, не обмежуючись тільки ними) форми, придатні для парентерального введення, наприклад шляхом ін'єкції або інфузії, наприклад, шляхом болюсної ін'єкції або безперервної інфузії. Якщо продукт призначений для ін'єкції або інфузії, він може бути у формі суспензії, розчину або емульсії в масляному або водному наповнювачі і він може містити допоміжні речовини, такі як суспендуючі речовини, консерванти, стабілізатори та/або диспергуючі агенти. Альтернативно цьому антитіло може знаходитися у безводній формі, призначений для відновлення за допомогою відповідної стерильної рідини перед застосуванням.

Під наповнювачем, як правило, мають на увазі матеріал, який можна застосовувати для зберігання, транспортування та/або введення сполуки, такої як фармацевтична діюча речовина, перш за все, антитіла, запропонованого у даному винаході. Наприклад, наповнювач може являти собою фізіологічно прийнятну рідину, яку можна застосовувати для зберігання, транспортування та/або введення фармацевтичної діючої речовини, насамперед антитіл, запропонованих у даному винаході. Після одержання композиції, запропоновані у винаході, можна безпосередньо вводити індивідууму. У деяких варіантах здійснення винаходу композиції адаптовані для введення ссавцям, наприклад, людям.

Фармацевтичні композиції, запропоновані у даному винаході, можна вводити будь-яким з численних шляхів, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) оральний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньоартеріальний, інтрамедулярний, внутрішньочеревний, підоболонковий, внутрішньошлунчковий, трансдермальний, черезшкірний шлях введення, місцеве застосування, підшкірний, інтраназальний, ентеральний, під'язичний, внутрішньоматковий або ректальний шлях введення. Для введення фармацевтичних композицій, запропонованих у винаході, можна застосовувати також безголковий шприц. Фармацевтичну композицію необов'язково можна одержати для орального введення, наприклад, у вигляді таблеток, капсул тощо, місцевого застосування або у формі ін'єкційного препарату, наприклад, у вигляді водних розчинів або суспензій. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтична композиція являє собою ін'єкційний препарат. Під обсяг винаходу підпадають також тверді форми, придатні для розчинення або суспендування у рідких наповнювачах

перед ін'єкцією, наприклад, фармацевтична композиція може знаходитися в ліофілізованій формі.

Для ін'єкції, наприклад, для внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції, або ін'єкції в ділянку пошкодження, діюча речовина може знаходитися у вигляді прийнятного для парентерального введення водного розчину, вільного від пірогенів та у якого придатні значення рН, ізотонічність та стабільність. Спеціалістам у даній галузі добре відомі способи одержання придатних розчинів з використанням, наприклад, ізотонічних наповнювачів, таких як ін'єкційний розчин хлориду натрію, ін'єкційний розчин Рінгера, ін'єкційний лактований розчин Рінгера. За необхідності можна включати консерванти, стабілізатори, буфери, антиоксиданти та інші добавки. Коли діюча речовина являє собою антитіло, пептид, молекулу нуклеїнової кислоти або іншу придатну для фармацевтичних цілей сполуку, запропоновану у даному винаході, яка призначена для введення індивідууму, то введення, як правило, здійснюють у "профілактично ефективній кількості" або в "терапевтично ефективній кількості" (залежно від обставин), яка є достатньою для надання сприятливого впливу на індивідуума. Фактична кількість, яка вводиться, а також швидкість та графік введення повинні залежати від природи і серйозності стану, який підлягає лікуванню. Для ін'єкції фармацевтична композиція, запропонована у даному винаході, може знаходитися, наприклад, у попередньо заповненому шприці.

Запропоновану у винаході фармацевтичну композицію, зазначену вище, можна вводити також орально у будь-якій прийнятній для орального введення лікарській формі, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) капсули, таблетки, водні суспензії або розчини. У випадку таблеток для орального застосування звичайні носії, які використовуються, включають лактозу і кукурудзяний крохмаль. Як правило, додають також замаслювачі, такі як стеарат магнію. Придатні розріджувачі для орального введення у вигляді капсул включають лактозу та безводний кукурудзяний крохмаль. Коли для орального застосування потрібні водні суспензії, то діючу речовину, тобто, запропоновану у винаході молекулу, кон'юговану з карго-транспортером, зазначену вище, об'єднують з емульгаторами та суспендуючими агентами. За необхідності можна додавати також певні підсолоджуючі речовини, коригенти або барвники.

Запропоновану у винаході фармацевтичну композицію можна застосовувати також місцево, особливо у тому випадку, коли мішень для лікування включає ділянки або органи, легкодоступні для місцевої обробки, наприклад, доступну епітеліальну тканину. Для кожної/кожного з таких ділянок або органів можна легко одержати придатні для місцевого застосування препаративні форми. Для місцевого застосування запропоновану у винаході фармацевтичну композицію можна одержати у вигляді придатної мазі, яка містить запропоновану у винаході фармацевтичну композицію, насамперед її компоненти, зазначені вище, суспендовані або розчинені в одному або декількох носіях. Носії для місцевого застосування включають (але, не обмежуючись тільки ними) мінеральне масло, рідкий вазелін, білий вазелін, пропіленгліколь, поліоксіетилен, похідні поліоксипропілену, віск, який емульгується і воду. Альтернативно цьому, запропоновану у винаході фармацевтичну композицію можна одержати у вигляді придатного крему або лосьйону. У контексті даного винаходу придатні носії включають (але, не обмежуючись тільки ними) мінеральне масло, сорбітан моностеарат, полісорбат 60, віск на основі складних цетилових ефірів, цетеариловий спирт, 2-октилдодеканол, бензиловий спирт та воду.

Введення лікарського засобу можна здійснювати згідно зі схемою введення одноразової дози або схемою введення багаторазових доз. Зокрема, фармацевтичну композицію можна постачати у вигляді продукту, який містить одноразову дозу. У деяких варіантах здійснення винаходу кількість антитіла у фармацевтичній композиції, насамперед у тому випадку, якщо вона поставляється у вигляді продукту, який містить одноразову дозу, не перевищує 200 мг, наприклад, не перевищує 100 або 50 мг.

Наприклад, фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, можна вводити щодня, наприклад, один або декілька разів на день, наприклад, один, два, три або чотири рази на день, протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або 21 або більшої кількості днів, наприклад, щодня протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6 місяців. У деяких варіантах здійснення винаходу фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, можна вводити щотижня, наприклад, один або два рази на тиждень, протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або 21 або більшої кількості тижнів, наприклад, щотижня протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 місяців або щотижня протягом 2, 3, 4 чи 5 років. Крім того, фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, можна вводити щомісяця, наприклад, один раз на місяць або через місяць протягом 1, 2, 3, 4 або 5 або більше років. Введення можна продовжувати також протягом усього життя. У деяких варіантах здійснення винаходу розглядається також тільки одне єдине введення, зокрема, за певних показань, наприклад, для профілактики інфекції, яка викликається вірусом грипу А. Наприклад, здійснюють одне введення (одичинну дозу), а додаткові дози можна вводити в один або декілька більш пізніх моментів часу, коли титр антитіла є недостатнім або передбачається, що є недостатнім для захисту.

У випадку застосування одноразової дози, наприклад, щоденної, щотижневої або щомісячної дози, кількість антитіла у фармацевтичній композиції, запропонованій у даному винаході, може не перевищувати 1 г або 500 мг. У деяких варіантах здійснення винаходу у випадку застосування одноразової дози кількість антитіла у фармацевтичній композиції, запропонованій у даному винаході, може не перевищувати 200 або 100 мг. Наприклад, у випадку застосування одноразової дози кількість антитіла у фармацевтичній композиції, запропонованій у даному винаході, може не перевищувати 50 мг.

Фармацевтичні композиції, як правило, включають в ефективній кількості одне або декілька антитіл, запропонованих у винаході, тобто, у кількості, достатній для лікування, полегшення, ослаблення, зниження або попередження розглянутого захворювання або стану, або для досягнення терапевтичної дії, яка піддається виявленню. Терапевтичні дії включають зниження або ослаблення патогенної активності або фізичних симптомів. Точна ефективна кількість для будь-якого конкретного індивідуума повинна залежати від його конституції, маси та

стану здоров'я, природи та серйозності стану, та терапевтичних препаратів або комбінації терапевтичних препаратів, вибраних для введення. Ефективну кількість для конкретної ситуації визначають шляхом стандартних експериментів та її визначення перебуває у компетенції лікуючого лікаря. Для цілей даного винаходу ефективна доза, як правило, може становити приблизно від 0,005 до приблизно 100 мг/кг, наприклад, від приблизно 0,0075 до приблизно 50 мг/кг або від приблизно 0,01 до приблизно 10 мг/кг. У деяких варіантах здійснення винаходу ефективна доза запропонованого у даному винаході антитіла (наприклад, кількість антитіла у фармацевтичній композиції) може становити від приблизно 0,02 до приблизно 5 мг/кг у перерахунку на масу тіла (наприклад, кг) індивідуума, якому її вводять.

Крім того, фармацевтична композиція, запропонована у даному винаході, може містити додатковий активний компонент, який може являти собою інше антитіло або компонент, що не є антитілом. Наприклад, фармацевтична композиція може містити один або декілька антивірусних препаратів (які не є антитілами). Крім того, фармацевтична композиція може містити також одне або декілька антитіл (які не являють собою антитіла, запропоновані у винаході), наприклад, антитіло проти інших антигенів вірусу грипу (відмінних від гемаглютиніну) або антитіло проти іншого вірусу грипу (наприклад, проти вірусу грипу В або проти вірусу грипу С). Таким чином, фармацевтична композиція, запропонована у даному винаході, може містити один або декілька додаткових активних компонентів.

Антитіло, запропоноване у даному винаході, може бути або в тій же фармацевтичній композиції, що і додатковий активний компонент, або в альтернативному варіанті антитіло, запропоноване у даному винаході, може міститися в першій фармацевтичній композиції, а додатковий активний компонент може міститися в другій фармацевтичній композиції, відмінній від першої фармацевтичної композиції. Таким чином, якщо передбачається більше одного додаткового активного компонента, то кожен додатковий активний компонент і антитіло, запропоноване у даному винаході, можуть міститися в різних фармацевтичних композиціях. Такі різні фармацевтичні композиції можна вводити або разом/одночасно, або в різні моменти часу, або в різні ділянки (наприклад, в різні частини організму).

Антитіло, запропоноване у даному винаході, та додатковий активний компонент можуть виявляти додаткову терапевтичну дію, наприклад, синергетичну терапевтичну дію. Поняття "синергізм" застосовують для позначення об'єднаної дії двох або більшої кількості діючих речовин, яка перевищує суму індивідуальних дій кожної з відповідних діючих речовин. Так, коли об'єднана дія двох або більшої кількості агентів призводить до "синергетичного інгібування" активності або процесу, це означає, що інгібування активності або процесу перевищує суму інгібуючих дій кожної з відповідних діючих речовин. Поняття "синергетична терапевтична дія" стосується терапевтичної дії, що спостерігається при об'єднанні двох або більшої кількості терапій, якщо терапевтична дія (яка оцінюється будь-якою кількістю параметрів) перевищує суму індивідуальних терапевтичних дій, які спостерігаються при застосуванні відповідних індивідуальних терапій.

У деяких варіантах здійснення винаходу композиція, запропонована у винаході, може включати антитіла, запропоновані у винаході, причому на частку антитіл може припадати принаймні аж до 50 мас. % (наприклад, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше) від загального вмісту білка у композиції. У композиції, запропонованій у винаході, антитіла можуть перебувати в очищеній формі.

У даному винаході запропонований спосіб одержання фармацевтичної композиції, яка включає стадії, на яких: (I) одержують антитіло, запропоноване у винаході; та (II) змішують очищене антитіло з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями.

В інших варіантах здійснення винаходу спосіб одержання фармацевтичної композиції включає стадію, на якій: змішують антитіло з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, де антитіло являє собою моноклональне антитіло, яке одержують з трансформованої В-клітини або з культивованої плазматичної клітини, запропонованої у винаході.

Як альтернативу доставки в терапевтичних цілях антитіл або В-клітин можна здійснювати доставку нуклеїнової кислоти (як правило, ДНК), яка кодує моноклональне антитіло, яке представляє інтерес, одержане з В-клітини або з культивованої плазматичної клітини, в організм індивідуума, так, щоб нуклеїнова кислота могла експресуватися *in situ* в організмі індивідуума з досягненням необхідної терапевтичної дії. Придатна для зазначеної мети генна терапія та вектори для доставки нуклеїнової кислоти відомі в даній галузі.

Фармацевтичні композиції можуть включати антимікробні препарати, насамперед у тому випадку, коли їх упаковують у мультидозовому форматі. Вони можуть містити детергенти, наприклад, Твін (полісорбат), такий як Твін 80. Детергенти, як правило, присутні в низьких концентраціях, наприклад, менше ніж 0,01 %. Композиції можуть також містити солі натрію (наприклад, хлорид натрію) для забезпечення тонічності. Наприклад, як правило, концентрація NaCl складає 10 ± 2 мг/мл.

Крім того, фармацевтичні композиції можуть містити цукровий спирт (наприклад, маніт) або дисахарид (наприклад, сахарозу або трегалозу), наприклад, концентрації приблизно 15-30 мг/мл (наприклад, 25 мг/мл), перш за все в тому випадку, коли вони підлягають ліофілізації або коли вони включають матеріал, відновлений з ліофілізованого матеріалу. Значення рН композиції, призначеної для ліофілізації, можна доводити перед ліофілізацією до рівня, що знаходиться між 5 і 8 або між 5,5 і 7, або становить приблизно 6,1.

Композиції, запропоновані у винаході, можуть містити один або декілька імунорегуляторних агентів. У деяких варіантах здійснення винаходу один або декілька імунорегуляторний(х) агент(ів) включає(ють) ад'ювант.

Медичне лікування та застосування

Наступним об'єктом даного винаходу є застосування антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини,

запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, для (I) профілактики та /або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А; або для (II) діагностування інфекції, яка викликається вірусом грипу А. Таким чином, у даному винаході запропонований також спосіб зниження інфекції, яка викликається вірусом грипу А, або зниження ризику інфекції, яка викликається вірусом грипу А, що включає: введення індивідууму, який потребує цього, антитіла в терапевтично ефективній кількості, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході. Крім того, у даному винаході запропоновано також застосування антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, для приготування лікарського засобу для профілактики, лікування або ослаблення інфекції, яка викликається вірусом грипу А.

Методи діагностування можуть включати приведення антитіла у контакт зі зразком. Такі зразки можна виділяти з організму індивідуума, наприклад, вони можуть являти собою виділений зразок тканини, взятий, наприклад, з носових проходів, синусових пазух, слинних залоз, легені, печінки, підшлункової залози, нирки, вуха, ока, плаценти, травного тракту, серця, яєчників, гіпофізу, надниркових залоз, щитовидної залози, головного мозку, шкіри або крові, наприклад, плазми або сироватки. Методи діагностики можуть включати також виявлення комплексу антиген/антитіло, насамперед після контакту антитіла із зразком. Таку стадію виявлення, зазвичай, здійснюють у лабораторії, тобто, без контакту з тілом людини або тварини. Приклади методів виявлення добре відомі спеціалістам у даній галузі та включають, наприклад, ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз).

Профілактика інфекції, яка викликається вірусом грипу А, стосується, перш за все, профілактичних заходів, якщо у індивідуума не діагностована інфекція, яка викликається вірусом грипу А (або діагностування не здійснювали, або результати діагностування були негативними), та/або у індивідуума не виявляються симптоми інфекції, яка викликається вірусом грипу А. Профілактика інфекції, яка викликається вірусом грипу А, є особливо важливою для індивідуумів, які мають при зараженні підвищений ризик серйозного захворювання або ускладнень, таких як вагітні жінки, діти (наприклад діти віком менше 59 місяців), люди похилого віку, індивідууми з хронічними медичними станами (такими як серцево-судинні, легеневі, ниркові, метаболічні, нервово-психічні, печінкові або гематологічні захворювання) та індивідууми з імуносупресивними станами (такими як ВІЛ/СНІД, які отримують хіміотерапію або стероїди або зі зловживаннями захворюваннями). Крім того, профілактика інфекції, яка викликається вірусом грипу А, є особливо важливою для індивідуумів, які мають підвищений ризик зараження вірусом грипу А, наприклад, внаслідок підвищеного контакту, наприклад, індивідууми, які працюють або перебувають у громадських місцях, зокрема, медичні працівники.

На відміну від цього, у випадку терапевтичних заходів індивідуум, як правило, інфікований вірусом грипу А, у нього діагностована інфекція, яка викликається вірусом грипу А, та/або виявляються симптоми інфекції, яка викликається вірусом грипу А. Слід зазначити, що поняття "лікування" та "терапія"/"терапевтичні заходи" щодо інфекції, яка викликається вірусом грипу А, включають (повне) виліковування, а також ослаблення/зменшення інфекції, яка викликається вірусом грипу А, або пов'язаних з нею симптомів.

Таким чином, антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану у даному винаході, можна застосовувати для лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, у індивідуумів, у яких діагностовано інфекцію, яка викликається вірусом грипу А, або у індивідуумів, які мають симптоми інфекції, яка викликається вірусом грипу А.

Антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану у даному винаході, можна застосовувати також для профілактики та/або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, у безсимптомних індивідуумів. У зазначених індивідуумів інфекція, яка викликається вірусом грипу А, може бути діагностована або не діагностована.

У деяких варіантах здійснення винаходу індивід, який підлягає лікуванню (наприклад, в рамках профілактичних або терапевтичних заходів, зазначених вище) страждає на аутоімунне захворювання або алергію; або має ризик розвитку аутоімунного захворювання або алергії. Індивідууми, які мають ризик розвитку аутоімунного захворювання або алергії, включають індивідуумів, які мають членів сім'ї з аутоімунними захворюваннями та/або алергіями, та індивідуумів, які (регулярно) піддаються впливу алергенів. Як продемонстровано у прикладах, представлених у даному описі, при створенні винаходу несподівано було встановлено, що антитіло, запропоноване у винаході, має лише дуже незначну імуногенність, зокрема, меншу імуногенність порівняно з антитілом без мутацій M428L/N434S. Таким чином, антитіло, запропоноване у винаході, може бути особливо цінним для індивідуумів, які мають ризик виражених імунних відповідей.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану у даному винаході, застосовують для профілактики та/або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, при цьому антитіло, нуклеїнову кислоту, вектор, клітину або фармацевтичну композицію вводять заздалегідь до трьох місяців до (можливого) зараження вірусом грипу А, наприклад, до двох тижнів до (можливого) зараження вірусом грипу А або до одного тижня до (можливого) зараження вірусом грипу А. Наприклад, антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у

даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану у даному винаході, застосовують для профілактики та/або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, при цьому антитіло, нуклеїнову кислоту, вектор, клітину або фармацевтичну композицію вводять заздалегідь аж до одного дня до (можливого) зараження вірусом грипу А. Зазначений режим обробки стосується насамперед профілактичних заходів.

Крім того, антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, можна застосовувати для профілактики та/або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, при цьому антитіло, нуклеїнову кислоту, вектор, клітину або фармацевтичну композицію вводять заздалегідь аж до трьох місяців до прояву першого симптому зараження вірусом грипу А або аж до одного місяця до прояву першого симптому зараження вірусом грипу А, наприклад, аж до двох тижнів до прояву першого симптому зараження вірусом грипу А або аж до одного тижня до прояву першого симптому зараження вірусом грипу А. Наприклад, антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, застосовують для профілактики та/або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, при цьому антитіло, нуклеїнову кислоту, вектор, клітину або фармацевтичну композицію вводять заздалегідь аж до трьох днів або до двох днів до прояву першого симптому зараження вірусом грипу А.

Як правило, після першого введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, можна здійснювати одне або декілька наступних введень, наприклад, використовуючи одну дозу на день або через день протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 днів або 21 дня. Після першого введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, можна здійснювати одне або декілька наступних введень, наприклад, використовуючи одну дозу одноразово або двічі на тиждень протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 тижнів або 21 тижня. Після першого введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, можна здійснювати одне або декілька наступних введень, наприклад, використовуючи одну дозу кожні 2 або 4 тижні протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 тижнів або 21 тижня. Після першого введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, можна здійснювати одне або декілька наступних введень, наприклад, використовуючи одну дозу кожні два або чотири місяці протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 місяців або 21 місяця. Після першого введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, можна здійснювати одне або декілька наступних введень, наприклад, використовуючи одну дозу один та два рази на рік протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 років.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, вводять у вигляді (одноразової) дози, яка становить від 0,005 до 100 мг/кг маси тіла або від 0,0075 до 50 мг/кг маси тіла, наприклад, (одноразової) дози, яка становить від 0,01 до 10 мг/кг маси тіла або у вигляді (одноразової) дози, яка становить від 0,05 до 5 мг/кг маси тіла. Наприклад, антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, вводять у вигляді (одноразової) дози, яка становить від 0,1 до 1 мг/кг маси тіла.

Антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, можна вводити будь-яким з численних шляхів, такими як оральний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньоартеріальний, інтрамедулярний, внутрішньочеревний, підболоноквий, внутрішньошлуночковий, трансдермальний, черезшкірний шлях введення, місцеве застосування, підшкірний, інтраназальний, ентеральний, під'язичний, внутрішньоматковий або ректальний шлях введення.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану в даному винаході, вводять профілактично, тобто до діагностування зараження вірусом грипу А.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, вводять у дозі, яка не перевищує половину дози, необхідної для профілактики або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, при використанні застосовуваного для порівняння антитіла, яке відрізняється від зазначеного антитіла тільки тим, що не містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга. Наприклад, антитіло, запропоноване у винаході, вводять у дозі, яка не перевищує одну третю, одну четверту, одну п'яту, одну шосту, одну сьому, одну

восьму або одну дев'яту дози, необхідної для профілактики або лікування інфекції, яка викликається вірусом грипу А, при використанні застосовуваного для порівняння антитіла, яке відрізняється від зазначеного антитіла тільки тим, що не містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга. У прикладі 5, представленому в даному описі, продемонстровано, що антитіло, запропоноване у винаході, яке містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга, є ефективним у значно нижчих дозах щодо застосовуваного для порівняння антитіла, яке відрізняється від запропонованого у винаході антитіла тільки тим, що не містить мутації M428L й N434S у константній ділянці важкого ланцюга. У прикладі 5 продемонстровано також, що підвищена ефективність антитіла, запропонованого у винаході, не залежить від рівнів антитіла в кровотоку.

Таким чином, антитіло, запропоноване у винаході, можна вводити індивідуумам, які мають безпосередній ризик зараження вірусом грипу А. Безпосередній ризик зараження вірусом грипу А, як правило, має місце під час епідемії грипу А. Відомо, що віруси грипу А можуть циркулювати та викликати сезонні епідемії захворювання (WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 6 листопада, 2018 р.). У помірному кліматі сезонні епідемії здебільшого відбуваються взимку, тоді як у тропічних областях грип може зустрічатися протягом усього року, викликаючи більш нерегулярні спалахи. Наприклад, у північній півкулі ризик епідемії грипу А є високим у листопаді, грудні, січні, лютому та березні, а у південній півкулі ризик епідемії грипу А є високим у травні, червні, липні, серпні та вересні.

Комбінована терапія

Введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, відповідно до способів і варіантів застосування, запропонованих у винаході, можна здійснювати індивідуально або в комбінації з коагентом (який позначають також у контексті даного опису як "додатковий активний компонент"), який може бути корисним для попередження та/або лікування грипозної інфекції.

Під обсяг даного винаходу підпадає також введення антитіла, запропонованого у даному винаході, нуклеїнової кислоти, запропонованої у даному винаході, вектору, запропонованого у даному винаході, клітини, запропонованої у даному винаході, або фармацевтичної композиції, запропонованої у даному винаході, коли їх вводять індивідууму до, одночасно або після введення коагенту або здійснення іншого терапевтичного режиму, корисного для лікування та/або попередження грипу. Зазначені антитіло, нуклеїнову кислоту, вектор, клітину або фармацевтичну композицію, які застосовують у комбінації із зазначеним коагентом, можна вводити в одній і тій композиції або в різних композиціях і з використанням одного і того ж шляху введення або різних шляхів введення. У контексті даного поняття типу "комбінована терапія", "спільне введення", "введення в поєднанні один з одним" і т.п. служать для позначення спільної дії лікарських засобів (які слід вводити "у комбінації"). Для цієї мети об'єднані лікарські засоби, як правило, присутні в місці дії одночасно та/або в тимчасовому вікні, що перекривається. Можливий також варіант, при якому дії, що запускаються одним із лікарських засобів, все ще продовжуються (навіть, якщо сам лікарський засіб може вже не бути присутнім) у момент введення іншого лікарського засобу, внаслідок чого дії обох лікарських засобів можуть об'єднуватися. Однак, якщо лікарський засіб вводили задовго до іншого лікарського засобу (наприклад, більш ніж за один, два, три або більшу кількість місяців або за рік), внаслідок чого він вже не був присутній (або його дія не тривала), то введення іншого лікарського засобу, як правило, не розглядається як введення "у комбінації". Наприклад, лікарська терапія, яка застосовується в інші сезони грипу, як правило, не стосується застосовуваної "у комбінації".

Зазначені інші терапевтичні режими чи коагенти можуть, наприклад, бути антивірусними. Антивірусний препарат (або "антивірусний агент" або "антивірусний лікарський засіб") стосується класу лікарської терапії, яка застосовується конкретно для лікування вірусних інфекцій. Аналогічно антибіотикам для бактерій, антивірусні препарати можуть мати широкий спектр антивірусної дії щодо різних вірусів або можуть являти собою специфічні антивірусні препарати, які застосовують щодо конкретних вірусів. На відміну від більшості антибіотиків антивірусні лікарські засоби, зазвичай, не руйнують їх патоген-мішень; натомість вони зазвичай інгібують його розвиток.

Таким чином, відповідно до іншого об'єкту даного винаходу антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропоноване/запропонований у даному винаході, нуклеїнову кислоту, запропоновану у даному винаході, вектор, запропонований у даному винаході, клітину, запропоновану у даному винаході, або фармацевтичну композицію, запропоновану у даному винаході, вводять у комбінації (до, одночасно або після) антивірусного препарату для (медичних) застосувань, зазначених у даному описі.

Як правило, антивірусний препарат може являти собою антивірусний препарат широкого спектру дії (який можна застосовувати щодо вірусів грипу та інших вірусів) або антивірусний препарат, специфічний щодо вірусу грипу. У деяких варіантах здійснення винаходу антивірусний препарат не являє собою антитіло. Наприклад, антивірусний препарат може являти собою низькомолекулярний лікарський засіб. Приклади низькомолекулярних лікарських засобів, які можна застосовувати для профілактики та/або лікування грипу, описані у Wu X., Wu X., Sun Q та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 7(4), 2017, сс. 826–845. З відомостей, представлених Wu зі співавторами, 2017 р., спеціалісту в даній галузі відомі різні антивірусні препарати, які можна застосовувати для профілактики та/або лікування грипу. Інші антивірусні препарати, які можна застосовувати під час грипу, описані у Davidson S. Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. Front Immunol. 9, 2018, с.1946; та у Koszalka P., Tilmanis D., Hurt A.C. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. Influenza Other Respir Viruses. 11(3), 2017, сс. 240–246.

Антивірусні препарати, які можна застосовувати для профілактики та/або лікування грипу, включають (I)

агенти, мішенню яких є функціональні білки самого вірусу грипу, та (II) агенти, мішенню яких є клітини-хазяїни, наприклад, епітеліальні клітини.

Агенти, які таргетують клітини-хазяїни, включають антивірусні препарати широкого спектра дії з класу тіазолідів, злиті з сіалідазою білки, інтерферони типу III, інгібітори Bcl-2 (В-клітинної лімфоми 2), інгібітори протеази, інгібітори V-АТФаза та антиоксиданти. Приклади антивірусних препаратів широкого спектру дії з класу тіазолідів включають нітазоксанид (NTZ), який швидко деацетилюється в крові до активної метаболічної форми, такої як тізоксанид (TZ), і друге покоління тіазолідних похідних, структури яких споріднені NTZ, таких як RM5061. Флудаз (DAS181) є прикладом злитих із сіалідазою білків. IFN типу III включають, наприклад, IFN λ . Приклади інгібіторів Bcl-2 включають (але, не обмежуючись лише ними) ABT-737, ABT-263, ABT-199, WENI-539 та A-1331852 (Davidson S. Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. Front Immunol. 9, 2018, с. 1946). Приклади інгібіторів протеаз включають нафамостат, леупептин, епсілон-амінокапронову кислоту, камостат та апротинін. Інгібітори V-АТФази включають Norakin®, Parkopan®, Antiparkin® та Akineton®. Прикладом антиоксиданту є альфа-токоферол.

У деяких варіантах здійснення винаходу антивірусний препарат являє собою агент, який таргетує функціональний білок самого вірусу грипу. Наприклад, антивірусний препарат може таргетувати функціональний білок вірусу грипу, який не являє собою гемаглютинін. Загалом, антивірусні препарати, які таргетують функціональний білок вірусу грипу, включають інгібітори проникнення, інгібітори гемаглютиніну, інгібітори нейрамінідази, інгібітори полімерази вірусу грипу (інгібітори РНК-залежної РНК-полімерази (RdRp)), інгібітори нуклеокапсидного білка, інгібітори іонного M2-каналу та гідрохлорид арбідолу. Приклади інгібіторів проникнення включають (але, не обмежуючись тільки ними) похідні тритерпеноїдів, такі як гліциризинова кислота (гліциризин) та гліцеретинова кислота; сапоніни; уралсапоніни М-У (такі як уралсапоніни М); декстрансульфат (DS); силімарин; куркумін та лізосоматропні агенти, такі як конканаміцин А, бафіломіцин А1 та хлороквін. Приклади інгібіторів гемаглютиніну включають (але не обмежуючись лише ними) BMY-27709; стахіфлін; продукти, які зустрічаються в природних умовах, такі як госипол, рутин, кверцетин, ксилонін і теафлавіни; тривалентні міметики глікопептидів, такі як сполука 1, описана у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 7(4), 2017, сс. 826–845; похідні підокапринової кислоти, такі як сполука 2, описана у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; природний продукт пентациклічних тритерпеноїдів, такий як сполука 3, описана у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; та пренільовані індолдикетопіперазинові алкалоїди, такі як неохінулін В. Приклади інгібіторів нуклеокапсидного білка включають (але, не обмежуючись тільки ними) нуклеозин, циклогексимід, напроксен та інгавірин. Приклади інгібіторів іонного M2-каналу включають (але, не обмежуючись тільки ними) дозволені для застосування інгібітори M2 амантадин та рімантадин та їх похідні; а також сполуки, які не стосуються похідних адамантанів, такі як похідні сперміну, спермідину, спіропіперидину та пінаманіну.

У деяких варіантах здійснення винаходу антивірусний препарат вибирають з інгібіторів нейрамінідази (NA) та інгібіторів полімерази вірусу грипу (інгібітори РНК-залежної РНК-полімерази (RdRp)). Приклади інгібіторів нейрамінідази (NA) включають (але не обмежуючись тільки ними) занамівір, осельтамівір, перамівір, ланінамівір; їх похідні, такі як сполуки 4 – 10, описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; та димерні кон'югати занамівіру (наприклад, описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; похідні бензойної кислоти (наприклад, описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845, наприклад, сполуки 11 – 14); піролідинові похідні (наприклад, описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845, такі як сполуки 15-18); кон'югати гінкгетин-сіалова кислота; флаваноїди та флаваноїди ізоскуттеллареїну та його похідні (наприклад, описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845); AV5080; та N-заміщені аналоги осельтамівіру (наприклад, описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845). Приклади інгібіторів полімерази вірусу грипу включають (але, не обмежуючись лише ними) (інгібітори РНК-залежної РНК-полімерази (RdRp)) RdRp-руйнівні сполуки, такі як описані у Wu X., Wu X., Sun Q. та ін. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics 7(4), 2017, сс. 826–845; PB2-специфічні інгібітори зв'язування кепу, такі як JNJ63623872 (VX-787); кеп-залежні інгібітори ендонуклеази, такі як балоксавір марбоксил (S-033188); інгібітори PA-ендонуклеази, такі як AL-794, EGCG (галат епігалокатехіну) та його альфатичні аналоги, N-гідроксамові кислоти та N-гідроксїміди, флутимід та його ароматичні аналоги, похідні тетрамової кислоти, L-742,001, ANA-0, поліфенольні катехіни, аналоги фенетилфенілфталімідів, макроциклічні бісбібензили, піримідиноли, фулерени, гідроксїхінолінони, гідроксїпіридинони, гідроксїпіридазинони, сполуки, які несуть тригідроксифеніл, 2-гідроксїбензаміди, гідроксїпіримідинони, β -дикетокислоти та їх біозостеричні похідні, тіосемікарбазони, бісдигідроксїіндолкарбокаміди та піридопіперазиндіони (Endo-1); та інгібітори нуклеозидів та аналогів азотистих основ, такі як рибавірин, фавіпіравір (T-705), 2'-дезоксї-2'-фторгуанозин (2'-FdG), 2'-заміщені аналоги карбануклеозидів, 6-метил-7-заміщені-7-дезапуринові нуклеозидні аналоги та 2'-дезоксї-2'-фторцитидин (2'-FdC). Наприклад, антивірусний препарат може являти собою занамівір, осельтамівір або балоксавір.

Таким чином, фармацевтична композиція, запропонована у даному винаході, може містити один або декілька додаткових активних компонентів. Антитіло, запропоноване у даному винаході, може бути присутнім у тій же фармацевтичній композиції, що і додатковий активний компонент (коагент). Альтернативно цьому антитіло, запропоноване у даному винаході, та додатковий активний компонент (коагент) входять в різні фармацевтичні композиції (наприклад, не в одну й ту саму композицію). Таким чином, якщо передбачається застосування декількох додаткових активних компонентів (коагентів), то кожен додатковий активний компонент (коагент) та антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, запропоноване/запропонований у даному винаході, можуть міститися у різних фармацевтичних композиціях. Зазначені різні фармацевтичні композиції можна вводити або спільно/одночасно, або в різні моменти часу та/або за допомогою різних шляхів введення.

Антитіло, запропоноване у даному винаході, та додатковий активний компонент (коагент) можуть надавати додаткову або синергетичну терапевтичну дію. Поняття "синергізм" застосовують для позначення об'єднаної дії двох або більшої кількості діючих речовин, яка перевищує суму індивідуальних дій кожної з відповідних діючих речовин. Так, коли об'єднана дія двох або більшої кількості діючих речовин призводить до "синергетичного інгібування" активності або процесу, це означає, що інгібування активності або процесу перевищує суму інгібуючих дій кожної з відповідних діючих речовин. Поняття "синергетична терапевтична дія" стосується терапевтичної дії, що спостерігається при об'єднанні двох або більшої кількості терапій, якщо терапевтична дія (яка оцінюється будь-якою кількістю параметрів) перевищує суму індивідуальних терапевтичних дій, які спостерігаються при застосуванні відповідних індивідуальних терапій.

Таким чином, у даному винаході запропонована також комбінація (I) антитіла, запропонованого у винаході, зазначеного в даному описі, та (II) антивірусного агента, описаного вище.

Короткий опис креслень

Нижче наведений короткий опис доданих креслень. Креслення призначені для більш детальної ілюстрації даного винаходу. Однак вони жодним чином не спрямовані на обмеження сутності винаходу.

На кресленнях показано:

на фіг. 1 – представлені у прикладі 2 дані про концентрацію людських антитіл FluAB_MLNS (незафарбовані кола) та FluAB_wt (застосовуване для порівняння антитіло; зафарбовані кола) у зразках плазми макак, виміряні методом ELISA, протягом періоду часу аж до дня 56;

на фіг. 2 – представлені у прикладі 3 дані про концентрацію в плазмі FluAB_MLNS (тварини C90142, C90190), одержані методом ELISA з використанням антитіла до CH2 для кількісної оцінки рівня загального людського МАТ або зв'язування антигену НА з метою визначення функціональності МАТ. На графіку представлені оброблені методом лінійної регресії залежність між кількісною оцінкою рівня загального людського МАТ та рівнем зв'язування НА для окремих тварин у вибрані моменти часу (дні 1, 21, 56, 86 та 113);

на фіг. 3 – представлені у прикладі 4 (А) дані про концентрацію людських антитіл FluAB_MLNS й FluAB_wt у мазках з носа, виміряні методом ELISA та стандартизовані щодо вмісту сечовини; та (Б) дані про біорозподілення людських антитіл FluAB_MLNS й FluAB_wt у вигляді вираженого у % співвідношення концентрацій, стандартизованих щодо вмісту сечовини, в мазках з носа та в плазмі. Нижче вказані ID індивідуальних тварин та варіант застосовуваного для інокуляції людського антитіла (FluAB_MLNS або FluAB_wt);

на фіг. 4 – представлена в прикладі 5 залежність від часу кумулятивної зміни маси тіла (BW) мишей лінії Tg32, яких обробляли або FluAB_wt (панелі Б, Р, кола), або FluAB_MLNS (панелі В, Д, квадрати) у дозі 1 мг/кг (панелі Б, В, сірі символи) та 0,3 мг/кг (панелі Г, Д, світло-сірі символи), або залишали без обробки (панель А, трикутники); всіх мишей інтраназально заражали вірусом PR8. Представлені дані для окремих тварин; жирною чорною лінією позначено середню залежність BW $\pm$ SD. Вказана кількість особин на групу. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ при порівнянні тільки з контролем (А), ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, у всіх випадках при порівнянні з тваринами, обробленими антитілом MEDI8852 у відповідні моменти часу, 2-сторонній дисперсійний аналіз з поправкою Бонфероні для множинних порівнянь;

на фіг. 5 – представлені у прикладі 5 результати порівняння % виживання заражених самців мишей лінії Tg32, яких або не піддавали обробці (пунктирна лінія), або обробляли дозою 1 мг/кг (ліва панель) або дозою 0,3 мг/кг (права панель) FluAB_wt або FluAB_MLNS. ** $p < 0,01$ при порівнянні з необробленими мишами (CTR) та обробленими FluAB_MLNS в дозі 0,3 мг/кг; °°° $p < 0,001$ при порівнянні з обробкою FluAB_wt, логранговий аналіз, метод Мантеля-Коксу;

на фіг. 6 – представлені в прикладі 5 дані про рівні циркулюючих ін'єктованих антитіл. Представлені індивідуальні циркулюючі рівні (мкг/мл) рівні FluAB_wt (кола) та FluAB_MLNS (квадрати), виміряні в сироватці мишей безпосередньо до (день 0) та через 6 днів після зараження. Столпчиками показані середні значення $\pm$ SD;

на фіг. 7 – схема планшета, описана у прикладі 6, яку використовували в аналізі нейтралізації in vitro;

на фіг. 8 – представлені у прикладі 6 дані про нейтралізуючу активність FluAB_MLNS та осельтамівіру при їх індивідуальному застосуванні щодо інфекції, яка викликається вірусом H1N1 (А, В) й H3N2 (Б, Г);

на фіг. 9 – представлені у прикладі 6 дані про об'єднану нейтралізуючу активність FluAB_MLNS та осельтамівіру щодо інфекції, яка викликається вірусом H1 (А) й H3 (Б). Дані представлені у вигляді відносних рівнів інгібування інфекції, яка викликається вірусами H1N1 (А) й H3N2 (В) на MDCK-клітинах, обумовлених FluAB_MLNS при його індивідуальному застосуванні та FluAB_MLNS у комбінації із взятим у гетеромілярних концентраціях осельтамівіром. Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD, отримані за трьома повторностями, кожну повторність отримували з використанням трьох незалежних культуральних планшетів;

на фіг. 10 – описані у прикладі 6 графіки медіанного ефекту комбінацій FluAB_MLNS та осельтамівіру. Дві сполуки серійно розводили у зазначених постійних співвідношеннях і додавали до MDCK-клітин, заражених або

штамом Н1 вірусу (А), або штамом Н3 вірусу (Б). Представлені також значення, отримані при використанні вибраних комбінацій у непостійних співвідношеннях (NCR);

на фіг. 11 – представлені у прикладі 6 дані про комбінаційні індекси, що характеризують дію FluAB_MLNS та осельтамівіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1. Крапки являють собою фактичні експериментальні значення, отримані при зазначених постійних співвідношеннях, збоку вказана об'єднана концентрація комбінації лікарський засіб - лікарський засіб. Пунктирними кривими показаний прогнозований комбінаційний індекс у всьому діапазоні дії;

на фіг. 12 – описані в прикладі 6 дані про комбінаційні індекси, які характеризують дію FluAB_MLNS та осельтамівіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н3Н2. Крапки являють собою фактичні експериментальні значення, отримані при зазначених постійних співвідношеннях, збоку вказано об'єднану концентрацію комбінації лікарський засіб - лікарський засіб. Пунктирними кривими показаний прогнозований комбінаційний індекс у всьому діапазоні дії;

на фіг. 13 – описані у прикладі 6 ізоболограми, які характеризують дію комбінацій FluAB_MLNS-осельтамівір щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1. Крапками позначені значення IC_{50} , IC_{75} та IC_{90} для комбінацій FluAB_MLNS-осельтамівір при різних постійних співвідношеннях. Для кожної експериментальної точки вказано об'єднану концентрацію;

на фіг. 14 – описані у прикладі 6 ізоболограми, які характеризують дію комбінацій FluAB_MLNS-осельтамівір щодо інфекції, яка викликається вірусом Н3Н2. Крапками позначені значення IC_{50} , IC_{75} та IC_{90} для комбінацій FluAB_MLNS-осельтамівір при різних постійних співвідношеннях. Для кожної експериментальної точки вказано об'єднану концентрацію;

на фіг. 15 – представлені у прикладі 6 дані про нейтралізуючу активність FluAB_MLNS та занамівіру при їх індивідуальному застосуванні щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1 (А, В) й Н3Н2 (Б, Г);

на фіг. 16 – представлені у прикладі 6 дані про об'єднану нейтралізуючу активність FluAB_MLNS та занамівіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1 (А) й Н3 (Б). Дані представлені у вигляді відносних рівнів інгібування викликані вірусами Н1Н1 (А) й Н3Н2 (Б) інфекції MDCK-клітин, що обумовлено FluAB_MLNS при його індивідуальному застосуванні та FluAB_MLNS у комбінації із взятим у гетеромолярних концентраціях занамівіром. Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD, які отримані за трьома повторностями, кожну повторність отримували з використанням трьох незалежних культуральних планшетів;

на фіг. 17 – описані у прикладі 6 графіки медіанного ефекту комбінації FluAB_MLNS та занамівіру. Дві сполуки серійно розводили у зазначених постійних співвідношеннях й додавали до клітин лінії MDCK, заражених або штамом вірусу Н1 (А), або штамом вірусу Н3 (Б). Представлені також значення, отримані при використанні вибраних комбінацій у непостійних співвідношеннях (NCR);

на фіг. 18 – представлені у прикладі 6 дані про комбінаційні індекси, які характеризують дію FluAB_MLNS та занамівіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1. Крапки являють собою фактичні експериментальні значення, отримані при зазначених постійних співвідношеннях, збоку вказано об'єднану концентрацію комбінації лікарський засіб - лікарський засіб. Пунктирними кривими показаний прогнозований комбінаційний індекс у всьому діапазоні дії;

на фіг. 19 – описані у прикладі 6 дані про комбінаційні індекси, які характеризують дію FluAB_MLNS та занамівіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н3Н2, отримані згідно з процедурою, описаною в прикладі 6. Крапки являють собою фактичні експериментальні значення, отримані при зазначених постійних співвідношеннях, збоку вказано об'єднану концентрацію комбінації лікарський засіб - лікарський засіб. Пунктирними кривими показаний прогнозований комбінаційний індекс у всьому діапазоні дії;

на фіг. 20 – описані у прикладі 6 ізоболограми, які характеризують дію комбінацій FluAB_MLNS-занамівір щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1. Крапками позначені значення IC_{50} , IC_{75} та IC_{90} для комбінацій FluAB_MLNS-занамівір при різних постійних співвідношеннях. Для кожної експериментальної точки вказано об'єднану концентрацію;

на фіг. 21 – описані у прикладі 6 ізоболограми, які характеризують дію комбінацій FluAB_MLNS-занамівір щодо інфекції, яка викликається вірусом Н3Н2. Крапками позначені значення IC_{50} , IC_{75} та IC_{90} для комбінацій FluAB_MLNS-занамівір при різних постійних співвідношеннях. Для кожної експериментальної точки вказано об'єднану концентрацію;

на фіг. 22 – представлені у прикладі 6 дані про нейтралізуючу активність FluAB_MLNS та балоксавіру при їх індивідуальному застосуванні щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1 (А, В) та Н3Н2 (Б, Г);

на фіг. 23 – представлені у прикладі 6 дані про об'єднану нейтралізуючу активність FluAB_MLNS та балоксавіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1 (А) й Н3 (Б). Дані представлені у вигляді відносних рівнів інгібування викликані вірусами Н1Н1 (А) й Н3Н2 (Б) інфекції MDCK-клітин, що обумовлено FluAB_MLNS при його індивідуальному застосуванні та FluAB_MLNS у комбінації із взятим у гетеромолярних концентраціях балоксавіром. Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD, отримані за трьома повторностями, кожну повторність отримували з використанням трьох незалежних культуральних планшетів;

на фіг. 24 – описані у прикладі 6 графіки медіанного ефекту комбінації FluAB_MLNS та балоксавіру. Дві сполуки серійно розводили у зазначених постійних співвідношеннях та додавали до MDCK-клітин, заражених або штамом вірусу Н1 (А), або штамом вірусу Н3 (Б). Представлені також значення, отримані при використанні вибраних комбінацій у непостійних співвідношеннях (NCR);

на фіг. 25 – описані у прикладі 6 дані про комбінаційні індекси, які характеризують дію FluAB_MLNS та балоксавіру щодо інфекції, яка викликається вірусом Н1Н1. Крапки являють собою фактичні експериментальні

значення, отримані при зазначених постійних співвідношеннях, збоку вказано об'єднану концентрацію комбінації лікарський засіб - лікарський засіб. Пунктирними кривими показаний прогнозований комбінаційний індекс у всьому діапазоні дії;

на фіг. 26 – описані в прикладі 6 ізоболограми, які характеризують дію комбінацій FluAB_MLNS-балоксавір щодо інфекції, яка викликається вірусом H3N2. Крапками позначені значення IC₅₀, IC₇₅ та IC₉₀ для комбінацій FluAB_MLNS-балоксавір при різних постійних співвідношеннях. Для кожної експериментальної точки вказано об'єднану концентрацію;

на фіг. 27 – представлені у прикладі 7 дані про зв'язування людського FcRn у розчині з імобілізованим FluAB_MLNS (сіра лінія) або FluAB_wt (чорна лінія), отримані за допомогою системи Octet при pH=6,0 (А) або pH=7,4 (Б). Момент часу 0 с являє собою момент часу, в який здійснювали перехід від вихідного буфера до буфера, який містить людський FcRn. Момент часу 420 с (сіра пунктирна вертикальна лінія) являє собою момент часу, в який здійснювали перехід на "порожній" буфер при відповідному значенні pH. Профілі асоціації та дисоціації вимірювали в реальному часі за допомогою Octet RED96 (фірма FortéBio);

на фіг. 28 – представлені у прикладі 9 дані про рівні ADA-відповіді, виміряні за допомогою ELISA, призначеного для виявлення мишачого IgG до лікарського препарату (А); стовпчики являють собою середнє значення $\pm$ SD для групи обробки); та результати кореляційного аналізу (Б) між рівнями циркулюючого людського IgG, виміряними через 14 днів після i.v. ін'єкції (вісь X), та ADA-сигналом, присутнім у цей самий момент часу (вісь Y). Для статистично значимих величин вказаний непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмана;

на фіг. 29 – представлені у прикладі 10 дані про рівні ADA-відповіді після підшкірної (s.c.) ін'єкції або FluAB_MLNS, або FluAB_wt. Дані представлені у вигляді ADA-сигналу (ОП при 450 нм), виявленого через 3 тижні після s.c. ін'єкції у кожному індивідуальному зразку сироватки (n=5/групу), попередньо розведеному у 3ФР у співвідношенні 1:25 й потім підданому 5-кратному серійному розведенню.

Приклади

Нижче наведені конкретні приклади, які ілюструють різні варіанти здійснення та аспекти винаходу. Однак обсяг даного винаходу не обмежується конкретними варіантами здійснення винаходу, представленими в даному описі. Описані нижче процедури та приклади наведені для більш ясного розуміння даного винаходу та здійснення його на практиці спеціалістами в даній галузі. Однак обсяг даного винаходу не обмежується наведеними як приклад варіантами здійснення винаходу, які слід розглядати тільки як ілюстрації окремих аспектів винаходу та способів, які є функціонально еквівалентними в рамках винаходу. Фактично на основі наведеного вище опису, доданих креслень і наведених нижче прикладів спеціалістам у даній галузі повинні стати очевидними різні модифікації, крім тих, які представлені в даному описі. Всі такі модифікації підпадають під обсяг формули винаходу, яка додається.

Приклад 1: Безпека та переносимість антитіла, запропонованого у даному винаході, для макак циномоглус

Розробляли та одержували антитіло, запропоноване у даному винаході, яке містить (I) послідовності CDR, представлені у SEQ ID NO: 1 – 6, та (II) дві мутації M428L та N434S у константних ділянках важких ланцюгів. Більш конкретно, антитіло містить (I) послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH), представлену в SEQ ID NO: 7, та послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL), представлену в SEQ ID NO: 8; та (II) дві мутації M428L та N434S у константних ділянках важких ланцюгів. Ще більш конкретно, антитіло містить важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 9, та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10. Зазначене антитіло позначено у даному описі як "FluAB_MLNS".

Для порівняння використовували антитіло "FluAB_wt", яке відрізняється від антитіла "FluAB_MLNS" тільки тим, що не містить дві мутації M428L та N434S у константних ділянках важких ланцюгів. Таким чином, антитіло "FluAB_wt", яке застосовується для порівняння, містить важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10.

Вводили шляхом одноразової внутрішньовенної 60-хвилинної інфузії або FluAB_MLNS, або FluAB_wt у дозі 5 мг/кг в об'ємі 2,5 мл/кг, використовуючи по три самки макак циномоглус (*Macaca fascicularis*) на групу, яка тестується. Кров або сечу для клінічного хімічного та гематологічного аналізів збирали до введення дози та в дні 7 та 21 після введення дози.

Після введення або FluAB_MLNS, або FluAB_wt у дозі 5 мг/кг шляхом 60-хвилинної внутрішньовенної інфузії здійснювали ретельний моніторинг стану здоров'я та маси самок макак циномоглус та регулярно одержували зразки крові та сечі. Жодних небажаних явищ – відмінних від гематоми через 24 години та еритродермії через 3 дні після введення дози у місці інюкації у деяких тварин – не було виявлено після внутрішньовенної інюкації антитіл. Усі тварини, як правило, були здорові, у них виявлене нормальне поглинання корму й вони загалом мали позитивний приріст маси тіла протягом експерименту. Клінічні хімічні, гематологічні параметри та результати аналізу сечі виявилися нормальними через 7 днів або 21 день після дозування порівняно з аналізами зразків, отриманих до введення дози.

Загалом, одноразова внутрішньовенна інфузія або FluAB_MLNS, або FluAB_wt макам циномоглус не індукувала небажаних явищ й загалом добре переносилася.

Приклад 2: Визначення концентрації та фармакокінетичних характеристик у плазмі

Метою представлених експериментів було визначення концентрації, встановлення часу напівжиття та порівняння фармакокінетичних параметрів антитіла FluAB_MLNS, запропонованого у даному винаході, з відповідними характеристиками застосовуваного для порівняння антитіла FluAB_wt у плазмі після одноразової

внутрішньовенної ін'єкції.

Перед дозуванням тварин тестували щодо відсутності у них (негативні тварини) специфічних для грипу антитіл з використанням дот-імунозв'язування. Серопозитивних тварин виключали з дослідження, оскільки наявність раніше існуючого імунітету могла впливати на результати тесту. Крім того, виключали тварин, у яких розвинулася відповідь у вигляді антитіл на лікарський препарат (ADA).

Шляхом одноразової 60-хвилинної внутрішньовенної інфузії вводили або FluAB_MLNS в дозі 5 мг/кг, або FluAB_wt в об'ємі 2,5 мл/кг, використовуючи по три самки макак циномолгус на групу, що тестується. Кров збирали у пробірки, які містили до дозування K_2EDTA , та обробляли для одержання плазми для тестування фармакокінетики через приблизно 1, 6, 24, 96, 168, 504, 840 й 1344 години (год.) після введення дози.

Концентрацію антитіл у плазмі визначали *in vitro* за допомогою ELISA-аналізу. Загалом метод полягав у наступному: антиген IAV-NA (антиген білка гемаглютиніну вірусу грипу A H1N1 A/California/07/2009 (з His-міткою); фірма Sino Biologicals) розводили до концентрації 2 мкг/мл ЗФР та 25 мкл додавали в лунки, розташовані на $\frac{1}{2}$ площі плоскодонного 96-лункового планшета для ELISA для сенсibilізації протягом ночі при 4 °C. Після сенсibilізації планшети двічі промивали 0,5-кратним ЗФР, доповненим 0,05 % Твін 20 (промивний розчин), використовуючи автоматичний промивний пристрій для ELISA. Потім планшети блокували, використовуючи 100 мкл/лунку ЗФР, доповненого 1 % БСА (блокуючий розчин) протягом 1 год. при кімнатній температурі (КТ), а потім промивали двічі. Зразки плазми центрифугували при 10000 g протягом 10 хв при 4 °C й потім розводили (у співвідношенні 1:10, а потім 1:30) до досягнення кінцевого розведення 1:300 у блокуючому розчині в 96-лункових планшетах для культури клітин. Тестоване мінімальне розведення (1:300) плазми макак, що застосовувалося для кількісної оцінки, гарантувало, що "ефект матриці" був незначним. Потім зразки піддавали серійному розведенню у співвідношенні 1:2 у трьох повторностях для одержання загалом 12 розведень. Аналогічним чином готували стандарти для кожного антитіла, яке підлягало тестуванню, за допомогою розведення антитіл у співвідношенні 1:300 до одержання концентрації 1 мкг/мл у пулі попередньо інокульованої плазми з усіх тестованих тварин, імітуючи матрицю тестованих зразків. Потім стандарти піддавали серійному розведенню у співвідношенні 1:3 в блокуючому розчині в трьох повторностях для одержання загалом 12 розведень. Додавали 25 мкл одержаних зразків або стандартів до лунок, сенсibilізованих гемаглютиніном (НА) та інкубували протягом 1 години при КТ. Після чотирьох промивок додавали для детекції по 25 мкл на лунку козячого антилюдського IgG, кон'югованого з HRP (AffiniPure F(ab')₂-фрагмент, Fcγ-фрагмент специфічний; фірма Jackson ImmunoResearch), розведеного у блокуючому розчині у співвідношенні 1:5000 (кінцева концентрація 0,16 мкг/мл), та інкубували при КТ протягом 1 год. Після чотирьох промивань планшети проявляли, додаючи 40 мкл на лунку субстрату SureBlue TMB (фірма Biosconcept). Після інкубації протягом ~7-20 хв при КТ, коли кольорова реакція досягала плато (max ОП ~3,8), додавали 40 мкл 1 % HCl на лунку для припинення реакції та вимірювали абсорбцію при 450 нм за допомогою спектрофотометра.

Для визначення концентрації антитіл у плазмі циномолгус будували графік залежності величин ОП, отриманих на основі результатів ELISA, від концентрації за допомогою програмного забезпечення Gen5 (фірма BioTek). Застосовували нелінійне припасування кривої, використовуючи модель зі змінною крутістю нахилу, чотири параметри та рівняння: $Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$. Величини ОП розведень зразків, які перебували у передбачуваному діапазоні аналізу стандартної кривої - за даними, отриманими в заздалегідь розрахованому експерименті, з використанням зразків для контролю якості у верхньому, середньому або низькому діапазоні кривої - інтерполювали для кількісної оцінки зразків. Потім визначали концентрацію антитіл у плазмі з огляду на кінцеве розведення зразка. Якщо більше однієї величини розведення зразка знаходилося в лінійному діапазоні стандартної кривої, використовували середнє значення цих величин. Фармакокінетичні (ФК) дані аналізували за допомогою WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (8.1.0.3530 Core Version, програмне забезпечення Phoenix, фірма Certara) з використанням наступних установок: модель: дані для плазми, введення шляхом постійної інфузії; кількість не відсутніх даних: 8; інтервал стійкого стану Tau: 1,00; час введення дози: 0,00; рівень дози: 5,00 мг/кг; тривалість інфузії: 0,04 дні; метод розрахунку: лінійний метод трапецій із лінійною інтерполяцією; зважування для розрахунків лямбда_z: однорідне зважування; метод лямбда_z: пошук найкращого підбору для лямбда_z, логарифмічна регресія. Побудову графіків та статистичні аналізи (лінійна регресія або аналіз викидів) здійснювали за допомогою програмного забезпечення Prism 7.0 (фірма GraphPad, Ла-Хольє, шт. Каліфорнія, США). Аналіз викидів здійснювали, використовуючи метод ROUT (Q=1 %), який дозволяє знаходити будь-яку кількість викидів у будь-якому напрямку.

Результати представлені на фіг. 1. Аналіз зразків плазми циномолгус, відібраних аж до дня 56 після інокуляції, продемонстрував, що запропоноване у даному винаході антитіло FluAB_MLNS мало подовжений час напівжиття *in vivo* щодо антитіла FluAB_wt, яке застосовували для порівняння (фіг. 1). За допомогою некомпартментального аналізу з використанням WinNonLin встановлено, що $T_{1/2}$ становило 19,5 дня для запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS, у той час як $T_{1/2}$ становило 11,6 днів для антитіла FluAB_wt, яке застосовували для порівняння. Нижня межа кількісної оцінки становила 300 нг/мл.

Загалом, запропоноване у даному винаході антитіло FluAB_MLNS мало подовжений час напівжиття *in vivo* щодо антитіла FluAB_wt, яке застосовували для порівняння принаймні аж до дня 56 після інокуляції.

Приклад 3: Тривала стабільність *in vivo*

Для оцінки *in vivo* стабільності та функціональної здатності щодо зв'язування з антигеном запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS протягом часу фармакокінетичні вимірювання (описані у прикладі 2) у групі, якій вводили запропоноване у даному винаході антитіло FluAB_MLNS, продовжували до днів 86 та 113 після інокуляції. У дні 1, 21, 56, 86, 113 після інокуляції кількісно оцінювали функціональну здатність FluAB_MLNS

з використанням методу ELISA для визначення зв'язування з гемаглютиніном (HA), який описаний у прикладі 2.

Крім того, визначали загальну кількість людських антитіл у плазмі макак за допомогою специфічного анти-CH2 ELISA, використовуючи як імобілізоване МАт антитіло, яке специфічно зв'язується з CH2-ділянкою людських Ат, але не з Ат мавп. Для вимірювання загальної кількості людського IgG та, отже, кількості всіх інокульованих людських антитіл у плазмі циномолюс, застосовували ELISA із захопленням за допомогою мишачого антитіла до CH2-домену, специфічного для людського IgG (клон R10Z8E9; фірма Thermo Scientific). Було підтверджено, що це МАт не дає перехресну реакцію з IgG мавп. Для сенсibilізації в лунки, розташовані на 1/2 площі плоскостонного 96-лункового планшета для ELISA, додавали мишачий антилюдський IgG-CH2 до ЗФР у концентрації 0,5 мкг/мл та інкубували протягом ночі при 4 °С. Потім планшети промивали й додавали 100 мкл/лунку блокуючого розчину з 5 % БСА протягом 1 години при КТ. Стандарти запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS готували шляхом розведення FluAB_MLNS до концентрації 1 нг/мл у блокуючому розчині. Потім стандарти серійно розводили з дублюванням у співвідношенні 1:1.5 у блокуючому розчині з одержанням загалом 12 розведень. Зразки плазми циномолюс центрифугували при 10000 g протягом 10 хв при 4 °С та серійно розводили до кінцевого розведення 1:1000, 1:5000 або 1:15000 в блокуючому розчині. Після промивання планшета 25 мкл зразків або стандартів додавали в планшет ELISA та інкубували протягом 1 год. при КТ. Після трьох промивок додавали для детекції по 25 мкл козячого антилюдського IgG, кон'югованого з HRP (AffiniPure F(ab')₂-фрагмент, Fcy-фрагмент специфічний; фірма Jackson ImmunoResearch), розведеного в блокуючому розчині з 1 % БСА, та інкубували при КТ протягом 45 хв. Після трьох промивань планшети проявляли, додаючи 40 мкл на лунку субстрату SureBlue TMB (фірма Bioconcept). Після інкубації протягом 20 хв при КТ додавали 40 мкл 1 % HCl для припинення реакції та вимірювали абсорбцію при 450 нм.

Результати представлені на фіг. 2. Обидва методи кількісної оцінки призводили до отримання подібних результатів щодо концентрації антитіл у плазмі циномолюс (фіг. 2). Додатковий аналіз на основі лінійної регресії продемонстрував, що залежність між кількісною оцінкою на основі HA-зв'язування та оцінкою загальної кількості антитіл до CH2 відповідає лінійній схемі для всіх чотирьох вибраних моментів часу. Таким чином, загальна кількість FluAB_MLNS, яка присутня в плазмі, мала функціональність щодо зв'язування зі стовбуровою ділянкою гемаглютиніну (HA) вірусу грипу А (IAV) також і після аналізу через 86 та 113 днів *in vivo*.

Загалом, при здійсненні подовженого експерименту для запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS продемонстрована наявність функціонального зв'язування антитіла та в результаті хорошої тривалої стабільності *in vivo* аж до 113 днів після інокуляції.

Приклад 4: Концентрація антитіл у мазках з носа та біорозподілення

Для вивчення біорозподілення запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS та антитіла FluAB_wt, яке застосовується для порівняння, між слизовою оболонкою носа та плазмою визначали концентрацію антитіла у мазках з носа. Для цієї мети мазки з носа макак, яких використовували у дослідженнях, описаних у прикладі 2, збирали через 24, 504 та 1344 год. після введення запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS або антитіла, яке застосовується для порівняння FluAB_wt. Концентрації антитіл FluAB_MLNS та FluAB_wt у мазках з носа визначали загалом відповідно до методу, описаного у прикладі 2 для визначення концентрацій у плазмі, з такими невеликими адаптаціями: (а) планшети для ELISA блокували протягом 2 годин при КТ; (б) зразки мазків з носа розводили, починаючи із співвідношення 1:2, використовуючи 1 % БСА в ЗФР, а потім піддавали серійному розведенню у співвідношенні 1:2 для одержання загалом 8 розведень; (в) як контроль "ефекту матриці" застосовували середовище для мазка з носа (RT MINI Viral Transport Medium; фірма Coran).

Для елімінації відмінностей при здійсненні процедури одержання мазків або кількості виділень з носа у кожній тварини і у різні моменти часу (дні 1, 21 та 56) результати, отримані з використанням мазків з носа, стандартизували відносно вмісту сечовини. Сечовина вільно дифундує в крові, і вона присутня у подібних кількостях у зазначених зразках плазми або мазків (Lim та ін., *Antimicrob Agents Chemother* 61(8), 2017, e00279-17). З цією метою здійснювали кількісне вимірювання азоту сечовини (BUN, азот сечовини крові), використовуючи набір для колориметричного вимірювання азоту сечовини ("Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit") (фірма Invitrogen), відповідно до процедури виробника. Загалом, метод полягав у наступному: зразки розводили у співвідношенні 1:3 у ЗФР та змішували з реагентами А й В з набору та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Зафарбований продукт окиснювально-відновної реакції виявляли при 450 нм, використовуючи рідер для 96-лункових мікропланшетів. Кількісну оцінку здійснювали за допомогою порівняння зразків із стандартами BUN, які знаходились у наборі та які обробляли аналогічним чином.

Результати представлені на фіг. 3. Стандартизована кількість антитіл у мазках з носа знижувалася з часом (фіг. 3А). Оцінка біорозподілення шляхом порівняння концентрацій у носі щодо плазми продемонструвала відсутність відмінностей між антитілом FluAB_MLNS, запропонованим у даному винаході та антитілом FluAB_wt, яке застосовується для порівняння (фіг. 3Б), це дозволяє припустити, що мутація MLNS-Fc хоч і пролонгувала час напівжиття FluAB_MLNS в плазмі, але не призводила до підвищення біорозподілення антитіла, яке знаходиться в слизовій оболонці носа.

Загалом, для трьох варіантів МАт не виявлено жодних суттєвих відмінностей у біорозподіленні між слизовою оболонкою носа та плазмою.

Приклад 5: Профілактична активність антитіла FluAB_MLNS, оцінена на інфікованих PR8 Tg32-мишах

Далі вивчали профілактичну активність запропонованого у даному винаході антитіла FluAB_MLNS у порівнянні з антитілом FluAB_wt з використанням мишачої моделі летальної інфекції грипу H1N1.

Для вивчення профілактичної ефективності 9-14-тижневим FcRn-/- hFcRn мишам лінії 32Tg (фон C57B6) ін'єктували внутрішньовенно (i.v.) (через хвостову вену) 5 мл/кг розчину, що містить запропоноване у даному

винаході антитіло FluAB_MLNS або антитіло FluAB_wt, яке застосовується для порівняння, використовуючи діапазон доз від 0,3 до 1 мг/кг. Через 24 години після і.в.-ін'єкції у мишей відбирали зразки крові з хвостової вени для визначення рівнів антитіл у сироватці до ін'єкції. Відбір зразків крові повторювали також у дні 6 та 13 після ін'єкції (р.і.). Як ін'єктованих антитілом, так і необроблених мишей анестезували (ізофлуран, 4 % в O₂, 0,3 л/хв) та здійснювали контрольне зараження інтраназально (і.п.) шляхом повільного закапування в обидві ніздрі 50 мкл (25 мкл/в кожну) ЗФР, що містить 5 летальних для 50 % мишей доз (5 MLD₅₀, що еквівалентно 1200 TCID₅₀/миша) вірусу грипу А (H1N1, A/Puerto Rico/8/34, відповідно до методу, описаного у Cottley R., Rowe C.A. та Bender, B.S. Influenza virus. Curr Protoc Immunol Chapter 19, Unit19.11–19.11.32, 2001). Кожну мишу протягом приблизно 1 хв тримали вертикально, злегка відкинувши назад голову, для зниження ймовірності витікання інюляту з ніздрів. Після завершення процедури та появи рефлексу випрямлення тварин повертали до клітки. Щодня здійснювали моніторинг зниження маси та симптомів захворювання у мишей аж до дня 14 р.і. та здійснювали їх умертвіння, якщо зниження становило понад 20 % від їх початкової маси тіла (де за 0 % приймали день зараження) або досягався показник захворюваності, який становить 4 бали. У таблиці 1 представлені деталі визначення показника захворюваності:

Таблиця 1

Показник захворюваності інфікованих PR8 мишей

Показник захворюваності (бал)	Клінічні ознаки
1	Здорові
2	Постійно скуповджена шерсть на шиї
3	Пилоерекція, можливо глибше дихання, зниження пильності
4	Утруднене дихання, тремор і загальмованість
5	Порушена хода, знижена рухливість, виснаження, ціаноз хвоста-вух
6	Смерть

Наприкінці експерименту всіх тварин умертвляли для збирання сироватки та легень.

Одержання сироватки:

Збирали приблизно 0.05 мл крові, в пробірки, які містять гель й витримували 30 хв при КТ. Пробірки центрифугували протягом 5 хв при 5500 об/хв (3200 × g), сироватку переносили у нові пробірки та зберігали при - 20 °С до застосування.

Здійснювали два незалежні експерименти відповідно до таких протоколів:

Таблиця 2

Протокол дослідження в експерименті 1

Група	Кіл-сть тварин	IV-обробка	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

Таблиця 3

Протокол дослідження в експерименті 2

Група	Кіл-сть тварин	IV-обробка	Доза МАт
1	9	-	-
2	10	FluAB wt	0,3 мг/кг
3	6	FluAB MLNS	0,3 мг/кг

Кількісне визначення циркулюючих МАт за допомогою ELISA:

Рівні циркулюючих антитіл у сироватці оцінювали у дні 0 та 6. Загалом метод полягав у наступному: половину площі планшетів для ELISA сенсibilізували протягом ночі при 4 °С рекомбінантним гемаглютиніном (НА) із H1N1-штаму A/California/07/09 (2 мкг/мл, в ЗФР, 25 мкл/лунку). Після блокади (ЗФР/1 % БСА, 100 мкл/лунку, 1 год. при КТ) і двох промивок (220 мкл/лунку) промивним розчином для ELISA (ЗФРТ), додавали з дублюванням обидва розведення сироватки (початкове розведення 1:150 для дози 1 мг/кг, 1:50 для дози 0,3 мг/кг) та стандарти антитіл (FluAB_MLNS та FluAB_wt, 0,1 мкг/мл) (25 мкл/лунку) та здійснювали серійні розведення (1:2 з одержанням 10

розведень сироватки, 1:3 з одержанням 8 розведень стандартів антитіл). Після інкубації протягом 1,5 години при КТ планшети промивали 4 рази ЗФРТ та додатково інкубували протягом 1,5 години при КТ з міченим HRP вторинним антилюдським антитілом (0,16 мкг/мл, 25 мкл/лунку). Після 4 промивок за допомогою ЗФРТ у планшети розподіляли розчин субстрату (25 мкл/лунку), давали пройти реакції протягом 14 хв й блокували за допомогою 1 % HCl (об./об., 25 мкл/лунку). Планшети зчитували остаточно при 450 нм за допомогою спектрофотометру для кількісної оцінки сигналу. Рівні концентрацій розраховували за допомогою моделі нелінійної регресії (модель із змінною крутістю нахилу, чотири параметри, фірма GraphPad Prism) log-залежність (агоніст) від відповіді.

Аналіз даних:

Дані представляли у вигляді графіка та аналізували з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism, версія 8.0 для Macintosh, GraphPad Software, Ла-Холья, шт. Каліфорнія, США), www.graphpad.com. Безперервні змінні оцінювали для визначення статистично значущої відмінності ($p < 0,05$, 95 %-вий довірчий інтервал), використовуючи загальноприйнятий 2-сторонній дисперсійний аналіз з поправкою Бонферроні для множинних порівнянь. Дані про виживання порівнювали з використанням логрангового аналізу методом Мантеля-Кокса (величина $p < 0,05$ розглядалася як критерій статистичної значущості). Об'єднували дані двох незалежних експериментів, описаних вище.

Результати:

Профілактичну активність оцінювали після i.v.-введення FluAB_MLNS та FluAB_MLNS (1 та 0,3 мг/кг) мишам лінії Tg32 за один день до контрольного зараження вірусом H1N1 PR8 за допомогою внутрішньоназального зараження. Результати представлені на фіг. 4–6.

Як показано на фіг. 4, у мишей, оброблених FluAB_MLNS в дозі або 1 мг/кг (панель Г), або 0,3 мг/кг (панель Д), виявлено меншу втрату маси порівняно з необробленими мишами (панель А) та мишами, яким ін'єктували FluAB_wt (панелі Б та В).

Більш висока захисна дія FluAB_MLNS у порівнянні з FluAB_wt підтверджена при аналізі виживання, дані про який представлені на фіг. 5.

Відмінності в ефективності між FluAB_MLNS й FluAB_wt не корелювали з різними рівнями циркулюючих антитіл у сироватці, виміряними через 1 та 7 днів після i.v.-введення антитіл (фіг. 6). Слід зазначити, що через 14 днів після ін'єкції були відсутні рівні циркулюючих антитіл, які піддаються вимірюванню (дані не представлені).

Загалом, для FluAB_MLNS на мишах лінії Tg32 продемонстровано більш високу захисну дію щодо H1N1 PR8 після контрольного інтраназального зараження вірусом щодо антитіла FluAB_wt, яке застосовується для порівняння. Ефективність не залежала від рівнів циркулюючих антитіл. Ці дані дозволяють припустити, що підвищена взаємодія FluAB_MLNS з hFcRn, що експресується мишами лінії Tg32, також опосередковує дії in vivo, не пов'язані з подовженим часом напівжиття антитіла, такі як підвищена ефективність з точки зору захисної активності.

Приклад 6: Комбінація антитіла FluAB_MLNS з різними антивірусними препаратами

Комбінації лікарських засобів забезпечують виражену можливість підвищення ефективності у випадку зниження ймовірності розвитку стійкості. Крім того, можлива адитивна або синергетична дія може в результаті забезпечувати підхід щадного дозування. Лікарські засоби проти грипу, схвалені в даний час FDA, включають інгібітори нейрамінідази осельтамівір та занамівір, а також схвалений останнім часом балоксавір марбоксил, який стосується класу інгібіторів ендонуклеази.

Для оцінки спільної активності запропонованого у винаході антитіла FluAB_MLNS з антивірусними препаратами осельтамівір, занамівір або балоксавір марбоксил щодо обох репрезентативних вірусних штамів H1N1 та H3N2 здійснювали аналіз нейтралізації in vitro для вивчення досягнутої в результаті інгібуючої дії. Аналіз спільної дії здійснювали з використанням графіка медіанного ефекту та розрахунку комбінаційного індексу (коефіцієнт синергізму) (CI).

Загалом, метод полягав у наступному: клітини MDCK (клітини нирки кокер-спанієля) висівали у розрахунок 30000 клітин/лунку в 96-лункові планшети (круглодонні, чорні). Клітини культивували при 37 °C в атмосфері з 5 % CO₂ протягом ночі. Через 24 години одержували 4-кратні розведення антитіла та антивірусних препаратів (осельтамівір, занамівір або балоксавір марбоксил) у 60 мкл середовища для зараження (середовище MEM (фірма Sigma Aldrich, каталожний № M0644) + Glutamax (фірма Invitrogen, 41090-028) + 1 мкг/мл обробленого TPCK (тозил-L-фенілаланінхлорметилкетон) трипсину (фірма Worthington Biochemical, № LS003750) + 10 мкг/мл канаміцину), використовуючи перехресні серійні розведення 1:2 FluAB_MLNS (починаючи з концентрації 166,7нМ, до одержання в кінцевому підсумку 9 горизонтальних точок) та різних антивірусних препаратів (осельтамівір, занамівір або балоксавір марбоксил), починаючи з концентрації 125нМ (250нМ для занамівіру), 7 вертикальних точок), згідно зі схемою планшета, представленого на фіг. 7.

Для кожної комбінації готували три незалежні планшети для створення трьох повторностей для кожного співвідношення комбінації лікарський засіб - лікарський засіб. Для кожної сполуки у кожен планшет включали одержані в результаті титрування зразки (а саме, по 9 точок для FluAB_MLNS та 8 точок для кожного антивірусного препарату). Розчин вірусу готували у концентраціях, відповідних 120×TCID₅₀, в 60 мкл, далі розводили або у співвідношенні 1:1 MEM, або змішували у співвідношенні 1:1 з розведеннями FluAB_MLNS та інкубували протягом 1 год. при 33 °C. Клітини промивали 2 рази, використовуючи 200 мкл/лунку MEM без добавок з подальшим додаванням 100 мкл тільки вірусу, або 100 мкл суміші FluAB_MLNS/вірус (100×TCID₅₀/лунку), та інкубували протягом 4 годин при 33 °C в атмосфері з 5 % CO₂. Після додавання 100 мкл/лунку середовища для зараження клітини додатково інкубували протягом 72 годин при 33 °C в атмосфері з 5 % CO₂. У день 3 після

зараження готували 20мкМ розчин гідрату натрієвої солі MuNANA (4-MUNANA (2-(4-метилумбеліферил)- α -D-N-ацетилнейрамінової кислоти) (фірма Sigma-Aldrich), № 69587) у MuNANA-буфері (MES 32,5мМ/CaCl₂ 4мМ, рН 6,5) та вносили з розрахунку 50 мкл/лунку у чорні 96-лункові планшети. Переносили в планшети по 50 мкл титрованого супернатанту, який містить або нейтралізуючий агент, або тільки вірус, та інкубували протягом 60 хв при 37 °С. Потім припиняли реакцію, додаючи 100 мкл/лунку 0,2М гліцину/50 % EtOH, рН 10,7. Флуоресценцію оцінювали кількісно при 460 нм за допомогою флуориметра (фірма Bio-Tek).

Відносний рівень нейтралізації вірусів розраховували за формулою:

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

де f_x означає флуоресцентний сигнал зразка (клітини + вірус + FluAB_MLNS + антивірусний препарат); $f_{\min}$ означає мінімальний флуоресцентний сигнал (тільки клітини без вірусу); $f_{\max}$ означає максимальний флуоресцентний сигнал (клітини + тільки вірус).

Дані щодо відносного рівня нейтралізації використовували для здійснення кількісного аналізу залежності доза-ефект для комбінацій лікарських засіб – лікарський засіб згідно з методом Chou та 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, сс. 27–55). Комбінаційний індекс, уражену фракцію (F_a) та ізоболограми отримували за допомогою програмного забезпечення CompuSyn (фірма ComboSyn Inc., Paramus, шт. Нью-Джерсі, США) (Chou T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews* 58, 2006, сс. 621–681).

Результати представлені на фіг. 8–26 та описані нижче.

Комбінація FluAB_MLNS та осельтамівіру

Відносну ефективність FluAB_MLNS та осельтамівіру щодо нейтралізації вірусів грипу А порівнювали *in vitro* з використанням двох вірусних серотипів, репрезентативних для обох штамів H3N2 та H1N1. Як показано на фіг. 8, обидві сполуки при їх індивідуальному тестуванні мали однакову залежну від дози здатність повністю інгібувати зараження клітин, оброблених незалежно або вірусом H3N3, або вірусом H1N1 (фіг. 8А, Б). Встановлено, що величини IC₅₀, розраховані з графіка медіанного ефекту (фіг. 8В, Г) після лог-лінеаризації (згідно з методом, описаним 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, сс. 27–55), знаходилися в наномольному діапазоні як для FluAB_MLNS (17,9 та 15,6нМ для штамів H3 й H1, відповідно), так і для осельтамівіру (7 та 9,1нМ для штамів H3 та H1 відповідно). Загалом, не виявлено суттєвих відмінностей щодо інгібуючої відповіді на FluAB_MLNS інфекції, яка викликається вірусами H3 і H1, тоді як вірус H1N1 виявився дещо більш чутливим до інгібуючої дії осельтамівіру.

Для тестування впливу комбінації FluAB_MLNS та осельтамівіру на нейтралізацію зараження MDCK-клітин вірусами H3 та H1 обидві сполуки серійно розводили у зазначених вище різних співвідношеннях та оцінювали ферментативну активність нейрамінідази (NA; як показник вмісту вірусу в культурі) у присутності різних концентрацій лікарського засобу та порівнювали впливи індивідуального лікарського засобу. Нейтралізуюча дія, виміряна у присутності FluAB_MLNS, істотно підвищувалася у випадку одночасної присутності гетеромольних концентрацій другої сполуки, що дозволяє припустити наявність синергетичної, а не просто адитивної дії щодо інфекції, яка викликається обома штамми H3 та H1 вірусів (фіг. 9). Виявлена невелика відмінність у чутливості вірусів H1 та H3 до інгібуючої дії осельтамівіру.

Для точного кількісного визначення передбачуваної синергетичної дії різних співвідношень у комбінації лікарських засобів дані щодо нейтралізації додатково перетворювали на основі принципу медіанного ефекту та аналізували за допомогою програмного забезпечення CompuSyn, як описано вище. На фіг. 10 представлений графік медіанного ефекту, що характеризує залежність впливів декількох різних постійних співвідношень комбінації FluAB_MLNS-осельтамівір.

У програмному забезпеченні CompuSyn використовується логарифмічне перетворення рівняння медіанного ефекту для експериментальних даних, що застосовують для розрахунку та ефективності (IC₅₀), та так званого комбінаційного індексу (CI) різних комбінацій лікарських засобів. CI являє собою отриманий із рівняння Chou-Talalay (медіанний ефект) параметр, який враховує фізико-хімічні властивості відповідно до закону діючих мас та визначається сумою двох співвідношень між часткою дози лікарського засобу 1, об'єднаної з лікарським засобом 2, необхідної для досягнення певної дії, поділеної на дозу лікарських засобів 1 та 2 при їхньому індивідуальному застосуванні, необхідної для одержання такої ж дії. Відповідно до цього математичного алгоритму CI=1 відповідає адитивній дії, CI < 1 відповідає синергізму, а CI > 1 відповідає антагонізму.

Як показано на фіг. 11 й 12, для всіх протестованих співвідношень комбінацій та для обох вірусів H1 (фіг. 11) та H3 (фіг. 12), передбачені величини CI в межах всього діапазону інгібованої фракції описувалися кривою, що лежить значно нижче 1, для всіх співвідношень комбінацій лікарських засобів, та фактичні експериментальні точки різних об'єднаних концентрацій також знаходилися у діапазоні нижче 1 практично для всіх комбінацій. У сукупності ці дані свідчать про виражену синергетичну дію FluAB_MLNS та осельтамівіру при їх об'єднанні.

В альтернативному підході зазначені дані можна описувати за допомогою діаграм ізобол (ізоболлограм), які дозволяють порівнювати еквівалентні концентрації як індивідуальних, так і лікарських засобів, які застосовуються в комбінації. Як продемонстровано на фіг. 13 та 14, розподілення величин IC₅₀, IC₇₅ та IC₉₀ для трьох різних співвідношень комбінацій знаходилося значно нижче ліній ізобол, які з'єднують відповідні величини IC₅₀, IC₇₅ та IC₉₀ для протестованих індивідуально лікарських засобів як у випадку H1 (фіг. 13), так і у випадку H3 (фіг. 14), що свідчить про стійкий синергізм (у той час як адитивна дія та антагонізм повинні описуватися еквіпотентними

точками, локалізованими або на або вище ізоболі для індивідуального лікарського засобу відповідно).

Комбінація FluAB_MLNS та занамівіру

Відносну ефективність FluAB_MLNS та занамівіру щодо нейтралізації вірусів грипу А також порівнювали *in vitro* на двох вірусних серотипах, репрезентативних для обох штамів H3N2 та H1N1. Як продемонстровано на фіг. 15 обидві сполуки при їх індивідуальному тестуванні мали залежну від дози здатність повністю інгібувати зараження клітин, оброблених незалежно або вірусом H3N3, або вірусом H1N1. Відносні розраховані величини IC₅₀ становили 23,1-24,4нМ для FluAB_MLNS та 10,7-13,7нМ для занамівіру.

Щодо спільної дії FluAB_MLNS та занамівіру на фіг. 16 продемонстровано, що аналогічно осельтамівіру, занамівір значно підвищував інгібуючу здатність FluAB_MLNS щодо обох вірусів H1 і H3.

Кількісну оцінку синергетичної дії також здійснювали за допомогою CompuSyn та описаного вище принципу медіанного ефекту. На фіг. 17 представлені графіки медіанного ефекту, які характеризують залежність впливів FluAB_MLNS та занамівіру. Розраховані величини CI для FluAB_MLNS та занамівіру представлені на фіг. 18 та 19, і вони чітко демонструють синергетичну дію обох лікарських засобів як щодо вірусу H1 (фіг. 18), так і вірусу H3 (фіг. 19), про що свідчить те, що величини становлять менше 1 для всіх протестованих експериментальних точок. Відповідно, щодо обох штамів вірусів ізоболограми свідчать про сильну синергетичну дію на рівні величин IC₅₀, IC₇₅ та IC₉₀ (що продемонстровано на фіг. 20 і 21), які всі виявилися істотно нижчими ніж величини IC для лікарського засобу при його індивідуальному застосуванні.

Комбінація FluAB_MLNS та балоксавіру марбоксилу

Схвалений останніми роками інгібітор ендонуклеази балоксавір марбоксил спочатку порівнювали з FluAB_MLNS індивідуально на обох штамів H1 й H3 аналогічно методу, описаному вище для осельтамівіру та занамівіру. Результати представлені на фіг. 22. Відносні розраховані величини IC₅₀ становили 20,1-15,4нМ для FluAB_MLNS та 4,9-2,3нМ для балоксавіру марбоксилу.

Хоча балоксавір має інший механізм дії щодо інгібування реплікації вірусу у порівнянні з інгібіторами NA, лікарський засіб все ще мав здатність значно підвищувати інгібуючу активність FluAB_MLNS, з чітко вираженою синергетичною дією (фіг. 23). Дані про інгібування, отримані з використанням різних співвідношень у комбінації, застосовували для розрахунку та побудови графіка медіанного ефекту за допомогою програмного забезпечення CompuSyn, та визначали тип взаємодії лікарський засіб – лікарський засіб згідно з описаним вище методом (фіг. 24). Розраховані величини CI для FluAB_MLNS та балоксавіру марбоксилу (фіг. 25) чітко демонструють наявність синергетичної дії між двома лікарськими засобами щодо обох вірусів H1 та H3, про що свідчить те, що величини становлять менше 1 для більшої частини протестованих експериментальних точок. Ізоболограми свідчать про сильну і повну синергетичну дію, встановлену на рівні величин IC₅₀, IC₇₅ та IC₉₀ (фіг. 26).

Загалом встановлено, що нейтралізуюча активність FluAB_MLNS щодо обох штамів H1 й H3 синергетично підвищувалася при використанні різних антивірусних препаратів, а саме: інгібіторів NA осельтамівіру та занамівіру, а також інгібітору ендонуклеази балоксавіру марбоксилу.

Приклад 7: Зв'язування з людським FcRn при різних pH

За допомогою біошарової інтерферометрії (BLI) проводили паралельне порівняння здатності FluAB_wt та FluAB_MLNS до зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn).

З цією метою зв'язування FluAB_wt та FluAB_MLNS з людським FcRn вимірювали за допомогою пристрою Octet RED96 (біошарова інтерферометрія BLI, фірма ForteBio). Біосенсиори, сенсibilізовані антитілом до людського Fab-CH1, попередньо гідрували в кінетичному буфері протягом 10 хв при КТ. Потім людське МАТ (FluAB_wt або FluAB_MLNS) наносили на біосенсиори у концентрації 1 мкг/мл в кінетичному буфері при pH 7,4 протягом 30 хв. Вихідний рівень вимірювали в кінетичному буфері (стерильний профільований 0,01 % вільний від ендотоксинів сироватковий альбумін, 0,002 % Твін-20 (Полісорбат 20), 0,005 % NaN₃ в 3ФР) при pH=7,4 або pH=6, протягом 4 хв. Потім завантажені людським Ат сенсори протягом 7 хв піддавали впливу розчину людського FcRn в концентрації 1 мкг/мл у кінетичному буфері при pH=7,4 або pH=6,0 для вимірювання асоціації FcRn-МАТ у різному оточенні (on-rate, швидкість реакції асоціації). Потім визначали дисоціацію в кінетичному буфері при такому ж значенні pH протягом ще 5 хв (off-rate, швидкість реакції дисоціації). Усі стадії здійснювали при перемішуванні при 1000 об/хв при 30 °С. Профілі асоціації та дисоціації визначали в реальному часі за зміною картин інтерференції.

Як продемонстровано на фіг. 27, антитіло FluAB_MLNS зв'язувалося з людським FcRn з більш високою афінністю порівняно з FluAB_wt при кислому pH (pH 6,0), у той час як не FluAB_MLNS, не FluAB_wt не зв'язувалися з FcRn при нейтральному pH (pH 7,4).

Приклад 8: Характеризація поліморфізмів, ідентифікованих у подовженому епітопі антитіла

Історичні поліморфізми в подовженому епітопі вивчали щодо їх впливу на нейтралізуючу активність FluAB_MLNS з використанням вірусів, створених за допомогою реверсивної генетики з використанням H1 NA або H3 NA (генетичним) фоном A/Puerto Rico/8/34 (PR8).

Однонуклеотидні поліморфізми інтродуктували у плазмиди PR8 H1 NA або A/Aichi/2/68 (Aichi) NA pHW2000 за допомогою сайтнаправленого мутагенезу. Зберігали рекомбінантний вірус грипу А в асоціації з H1 або H3 NA на PR8-фоні з використанням стандартних методів (наприклад, описаних 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), травень 200 г., сс. 6108-6113; doi: 10.1073/pnas.100133697).

Нейтралізуючу активність оцінювали на MDCK клітинах з використанням стандартних методів. Наприклад, нейтралізуючу активність можна оцінювати на MDCK-клітинах, наприклад, 96-лункових планшетах. Для цієї мети

МСДК-клітини висівали з розрахунку 30000 клітин/лунку за 24 години до зараження. Антитіло FluAB_MLNS можна інкубувати з вірусом протягом 1 години при 37 °С перед додаванням до МДСК-клітин. Для цього можна створювати 9 серійних розведень у співвідношенні 1:2,5 FluAB_MLNS у середовищі для зараження і кожне розведення можна тестувати у трьох повторностях (наприклад, 50 мкг/мл – кінцева концентрація 0,03 мкг/мл) та можна інкубувати з 120 TCID₅₀ вірусу протягом 1 год. при 37 °С. МДСК-клітини можна промивати двічі за допомогою 3ФР, можна додавати 100 мкл/лунку розчину вірус: антитіло та клітини можна інкубувати протягом 4 годин при 37 °С. Через 4 години до клітин можна додавати 100 мкл/лунку середовища для зараження. Після інкубації протягом 72 годин при 37 °С, вірусну РНК можна екстрагувати та вимірювати за допомогою qOT-ПЛР, наприклад, використовуючи WHO-праймери (World Health Organization. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A H1N1. 28 квітня 2009 г.). Величина IC₅₀ являє собою концентрацію антитіла в мкг/мл, при якій реплікація вірусів знижується на 50 %, та її можна розраховувати за допомогою апроксимації даних, стандартизованих щодо результатів, отриманих у контрольних лунках (які не містять вірус та містять тільки вірус), нелінійної 4-параметричної логістичної кривої.

Дані про нейтралізуючу активність FluAB_MLNS щодо поліморфізмів H1 та H3 HA в подовженому епітопі представлені нижче в таблиці 4.

Таблиця 4

Вірус	Амінокислотні зміни в HA	FluAB_MLNS	
		Геометр. середнє, що характеризує нейтралізацію IC ₅₀ (мкг/мл)	Кратність зміни щодо WT-вірусу
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 означає A/Aichi/2/68; геометр. середнє означає геометричне середнє; HA означає гемаглютинін; NA означає непридатно; PR8 означає A/Puerto Rico/8/34 H1N1; wt означає дикий тип

Щодо вірусів, які кодують H3 HA, встановлено, що антитіло FluAB_MLNS нейтралізувало віруси з мутаціями HA1 P11S, HA2 D46N або HA2 N49T, що характеризувалося величинами IC₅₀, подібними до аналогічних величин для вірусу дикого типу (зміна IC₅₀ < 2-кратного щодо вірусу дикого типу). Щодо вірусів, які кодують H1 HA, встановлено, що FluAB_MLNS нейтралізувало віруси, які кодують HA2 N146D, що характеризувалося величинами IC₅₀, подібними до аналогічних величин для вірусу дикого типу (зміна IC₅₀ < 2-кратного щодо вірусу дикого типу). Крім того, застосовуваний штам дикого типу PR8 кодував поліморфізми L38Q та D46N HA2 та його нейтралізація антитілом FluAB_MLNS характеризувалася величиною IC₅₀, що становить 4,7 мкг/мл. Загалом встановлено, що у випадку FluAB_MLNS усі вивчені поліморфізми призводили до кратності зміни IC₅₀ < 2 у порівнянні з вірусом дикого типу. Загалом антитіло FluAB_MLNS ефективно нейтралізувало всі вивчені історичні поліморфізми у подовженому епітопі (H3 HA: HA1 P11S, HA2 D46N або HA2 N49T; H1 HA: N146D).

Приклад 9: Відповідь у вигляді антитіла на лікарський препарат у Tg32-мишей

Щодо мутації M428L/N434S в даний час вважається, що ця мутація підвищує імуногенність антитіл, які містять вказану мутацію (Brian C. Mackness, Julie A. Jaworski, Ekaterina Boudanova, Anna Park, Delphine Valente, Christine Mauriac, Olivier Pasquier, Thorsten Schmidt, Mostafa Kabiri, Abdullah Kandira, Katarina Radošević та Huawei Qiu. Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life, mAbs, 11:7, 2019, сс. 1276-1288; Maeda A., Iwayanagi Y., Haraya K. та ін. Identification of human IgG1 variant with enhanced FcRn binding and without increased binding to rheumatoid factor autoantibody. MAbs 9(5), 2017, сс. 844–853).

Для оцінки імуногенності, зокрема відповіді проти лікарського препарату (антитіла до лікарського препарату; ADA), антитіла FluAB_MLNS у порівнянні з батьківським антитілом FluAB_wt, двом різним групам (n=5) TG32-мишей (миші, трансгенні за людським FcRn) ін'єкували i.v. моноклональні антитіла або FluAB-MLNS, або FluAB_wt у дозі 5 мг/кг. Потім для оцінки циркулюючих рівнів ін'єктованих МАт одержували зразки крові у різні моменти часу. Зразки, відібрані в дні 14 і 21 після ін'єкції, використовували для оцінки за допомогою специфічної ELISA відповіді у вигляді антитіл до лікарського препарату (ADA), що викликається ін'єктованими моноклональними людськими антитілами.

Загалом метод полягав у наступному: очищеними моноклональними антитілами FluAB_wt та FluAB_MLNS в концентрації 2 мкг/мл сенсibiliзували 96-лункові планшети. Після блокади сироватку з оброблених тварин, отриману через 14 днів та 21 день, розведену у співвідношенні 1: 180, інкубували протягом 1,5 год. при кімнатній температурі (КТ). Після промивань до планшетів додавали мічений пероксидазою F(ab')₂-фрагмент козячого антимишачого IgG (0,16 мкг/мл) та інкубували протягом 1,5 год. при КТ. Потім виявляли ADA IgG (мишачі антитіла проти ін'єктованих антитіл FluAB_wt та FluAB_MLNS) з використанням відповідного субстрату та результати зчитували за допомогою спектрофотометра. Дані представлені у вигляді значень ОП (450 нм), отриманих у кожному індивідуальному зразку сироватки (n=5/групу), зібраному через 14 днів та через 21 день після i.v.-введення антитіла. Сироватку з наївних Tg32-мишей (ctrl) застосовували як негативний контроль.

Результати представлені на фіг. 28. При створенні винаходу несподівано було встановлено, що сигнал, який відповідає мишачому сироватковому IgG, що дає реакцію з антитілом FluAB-MLNS, виявився дуже низьким та відповідав сигналу, виявленому у контролі, тобто, у не підданих ін'єкції тварин, у той час як на відміну від цього ADA-відповідь у сироватці мишей, яким ін'єктували FluAB_wt, виявилася дуже високою як через 14 днів, так і через 21 день після i.v.-ін'єкції (фіг. 28A). Крім того, рівні ADA, встановлені у день 14 після ін'єкції, суттєво й зворотно корелювали з рівнями циркулюючого FluAB_wt (рівні FluAB_wt у сироватці знижувалися через присутність мишачих антитіл проти FluAB_wt), у той час як рівні циркулюючого FluAB-MLNS, визначені в цей же час, були фактично суттєво більш високими та гомогенними (фіг. 28Б).

Загалом, ці дані свідчать про те, що несподівано відповідь проти лікарського препарату (антитіла до лікарського препарату; ADA), та, як наслідок, імуногенність FluAB_MLNS знижувалися в порівнянні з FluAB_wt.

Приклад 10: Відповідь у вигляді антитіл до лікарського препарату та імуногенність після s.c.-введення

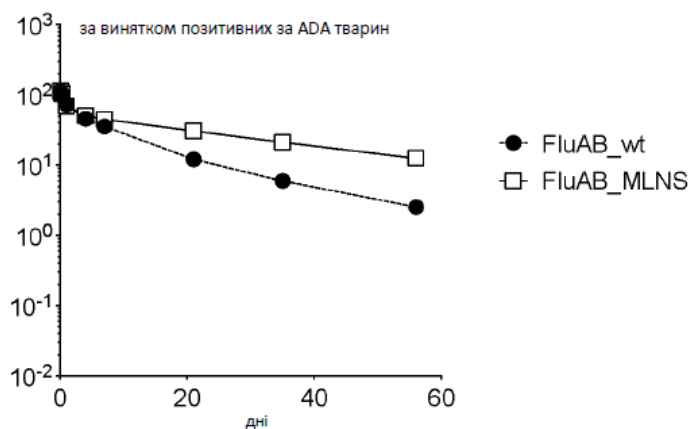
Для додаткового підтвердження зазначених несподіваних результатів у форматах, які викликають більшу імуногенність, різним групам TG32-мишей (n=5) ін'єктували або FluAB-MLNS, або FluAB_wt (5 мг/кг) підшкірно (s.c.), що зазвичай розглядається як більш імуногенний шлях введення. Через 3 тижні після s.c.-введення вимірювали рівні антитіл до лікарського препарату в сироватці за допомогою специфічного для оцінки мишачих антитіл до лікарських препаратів ELISA (згідно з методом, описаним у прикладі 9) у сироватці мишей, яким ін'єктували s.c. або FluAB_wt, або FluAB_MLNS. Як негативний контроль використовували пул сироватки з 10 наївних необроблених тварин.

Результати представлені на фіг. 29. Незважаючи на більш імуногенний формат дослідів у тварин, оброблених s.c. FluAB-MLNS, все ще не виникала гуморальна імуногенна відповідь, що підтверджено на основі титру анти-hlgG антитіл у сироватці, що перебиває титр, виявлений у сироватці контрольних тварин, яких не піддавали ін'єкції. І навпаки, титр ADA у тварин, оброблених FluAB_wt, виявився чітко позитивним та піддавався вимірюванню у всіх оброблених тварин. Підтверджена зворотна кореляція між циркулюючими рівнями ін'єктованого антитіла та ендогенною анти-hlgG-відповіддю у сироватці мишей, яким ін'єктували тільки FluAB_wt (дані не представлені).

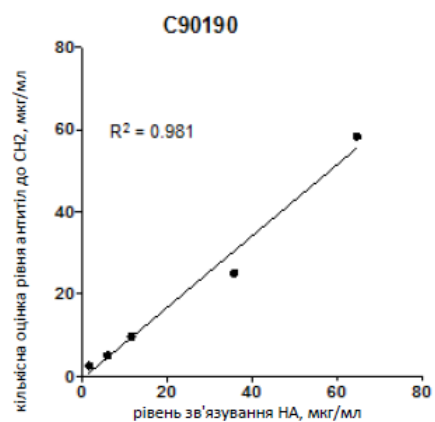
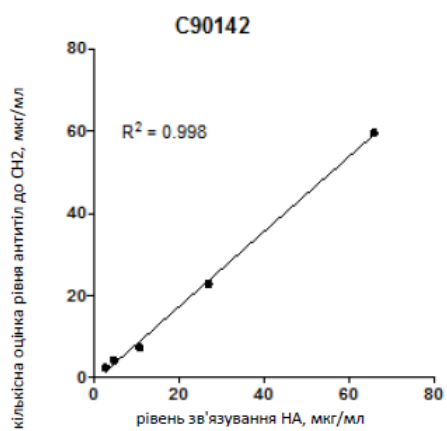
Зазначені дані є несподіваними та демонструють, що антитіло FluAB_MLNS викликає меншу імуногенність у порівнянні з його батьківським антитілом FluAB_wt.

SE Q ID NO	
FluAB_MLNS	
SE Q ID NO: 1	SYNAVWN
SE Q ID NO: 2	RTYYRSGWYNDYAESVKS
SEQ ID NO: 3	SGHITVFGVNVDAFDM
SEQ ID NO: 4	RTSQSLSSYTH
SEQ ID NO: 5	AASSRGS
SEQ ID NO: 6	QQSRT
SEQ	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDTSKNQF

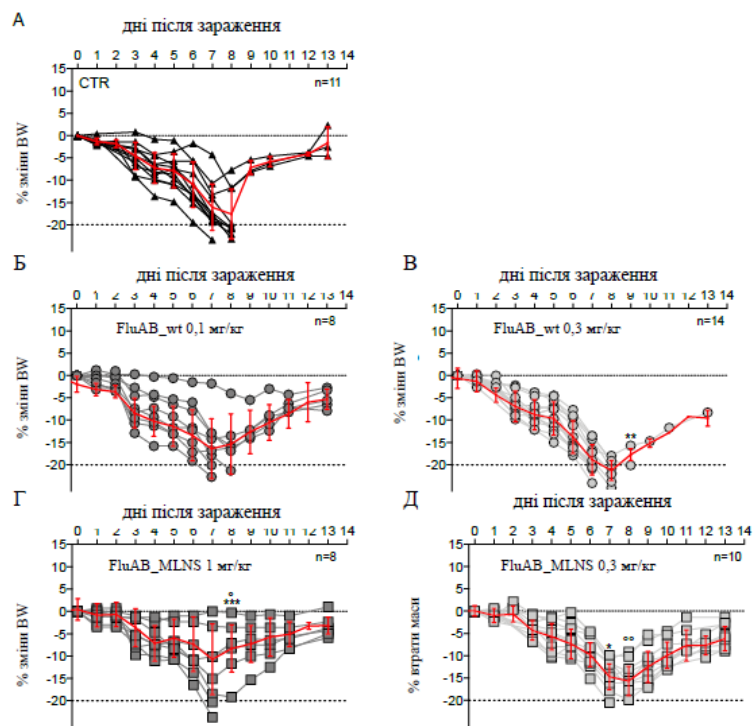
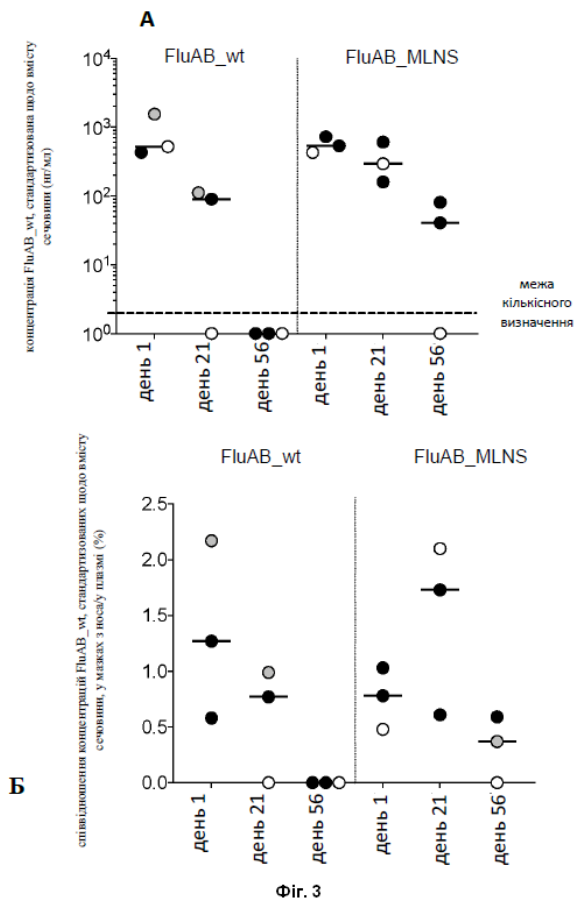
ID NO: 7	
SEQ ID NO: 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRSGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA
SEQ ID NO: 9	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDTSKNQF DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
SEQ ID NO: 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRSGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA
FluAB_wt	
SEQ ID NO: 11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDTSKNQF DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
Нуклеотидні послідовності FluAB_MLNS	
SEQ ID NO: 12	CAAGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGTCTGGTGAAGCCTAGCCAGACTCTGTCTTTAACTTGCGCCATCTCCGGCG CCGATACTAGCAAGAACCAGTTCTCTTTACAGCTGAACAGCGTGACTCCCGAAGACACTGCCGTGTACTACTGCGCTCGT
SEQ ID NO: 13	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCTCTTTAAGCGCTAGCGTGGGCGATAGGGTCACTATCACTTGTCGTA TAGCCA TCAGCTCTTTACAGCCCGAAGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTCGTACTTTTCGGCCAAGGTACTAAGGTGGAG
SEQ ID NO: 14	CAAGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGTCTGGTGAAGCCTAGCCAGACTCTGTCTTTAACTTGCGCCATCTCCGGCG CCGATACTAGCAAGAACCAGTTCTCTTTACAGCTGAACAGCGTGACTCCCGAAGACACTGCCGTGTACTACTGCGCTCGT CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGAC ACAAGCGGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACAATGCCCCACCGTGCCGAGCACCTGAACTCCTGGCGGGACC ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGA AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG AGCCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 15	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCTCTTTAAGCGCTAGCGTGGGCGATAGGGTCACTATCACTTGTCGTA TAGCCA TCAGCTCTTTACAGCCCGAAGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTCGTACTTTTCGGCCAAGGTACTAAGGTGGAG TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAG



Фіг. 1

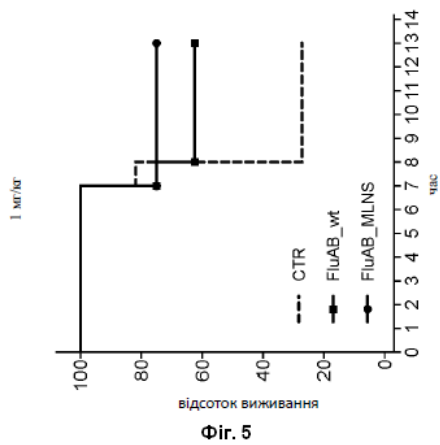
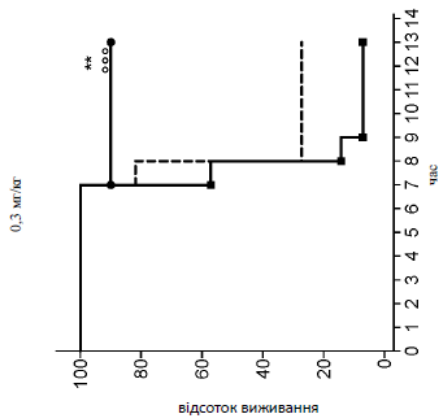


Фіг. 2

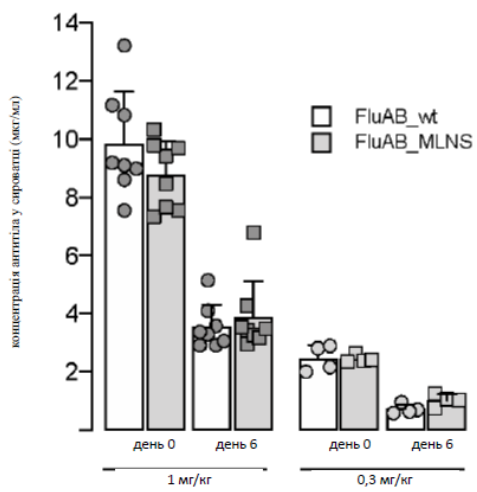


* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ при порівнянні з контролем
* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ при порівнянні з FluAB_wt

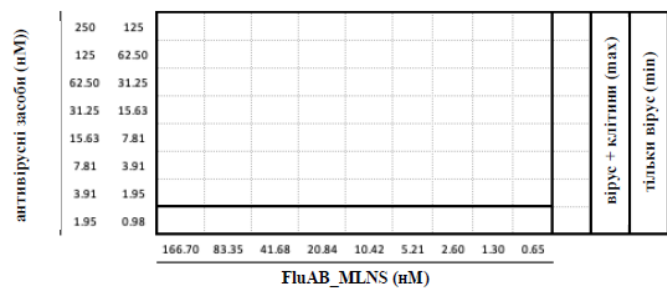
Фіг. 4



Фіг. 5

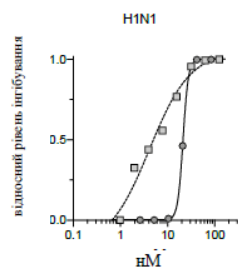


Фіг. 6

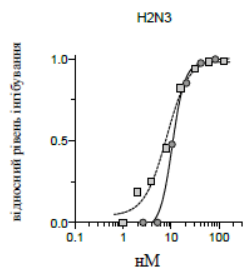


Фиг. 7

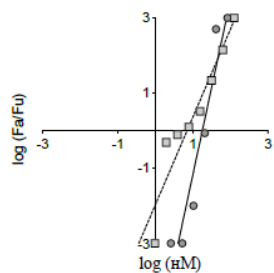
A



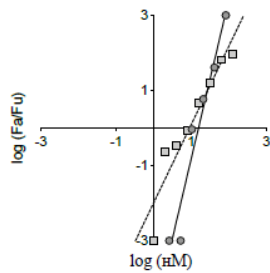
Б



В

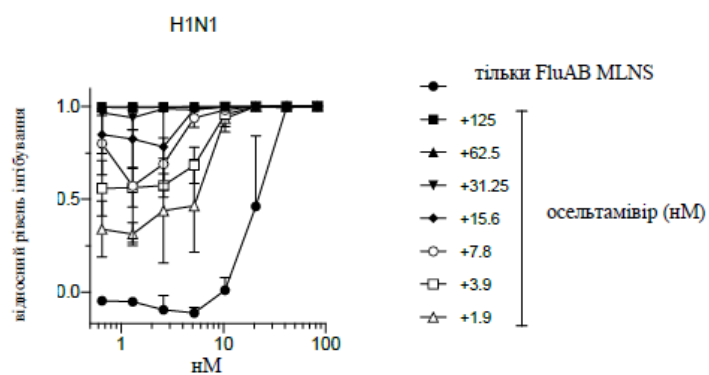


Г

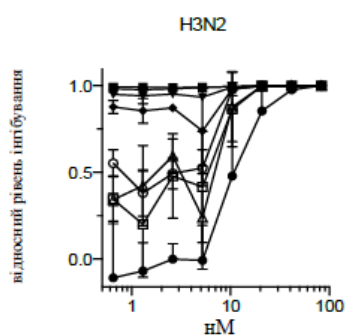


Фиг. 8

А

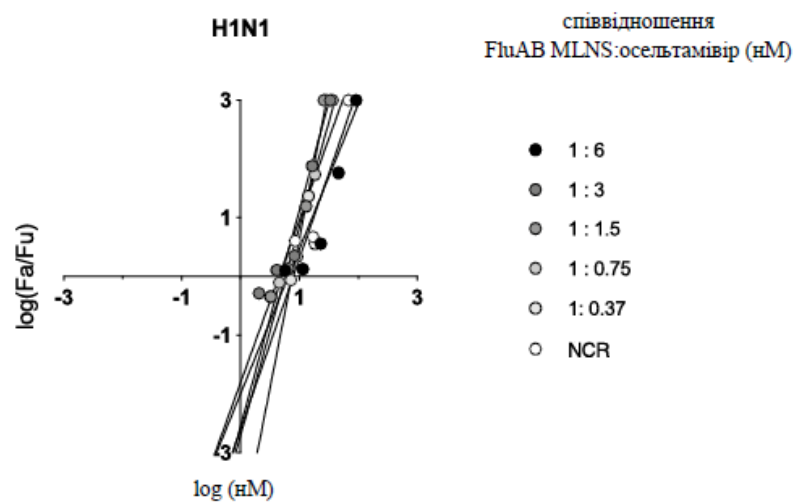


Б

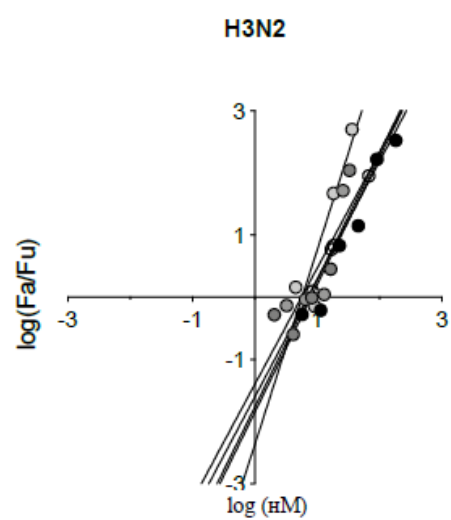


Фіг. 9

A



Б



Фиг. 10

H1N1

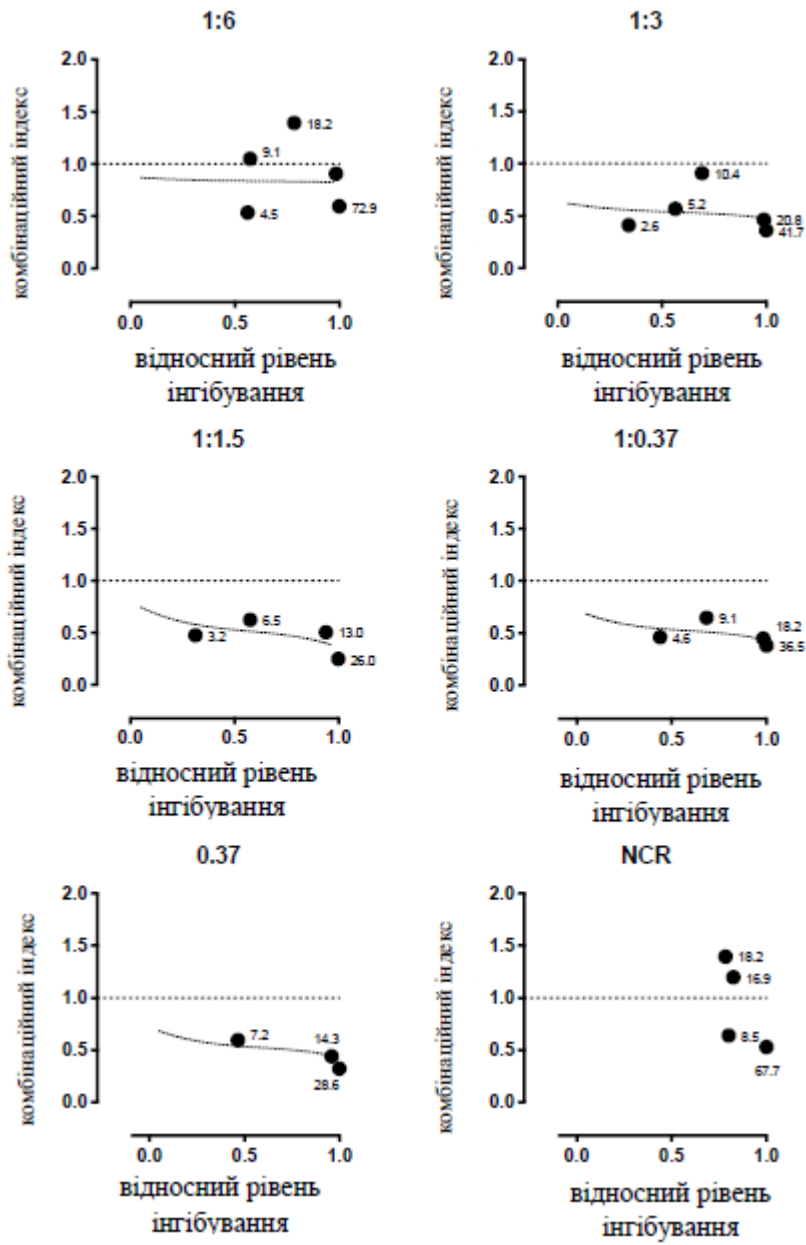


Fig. 11

H3N2

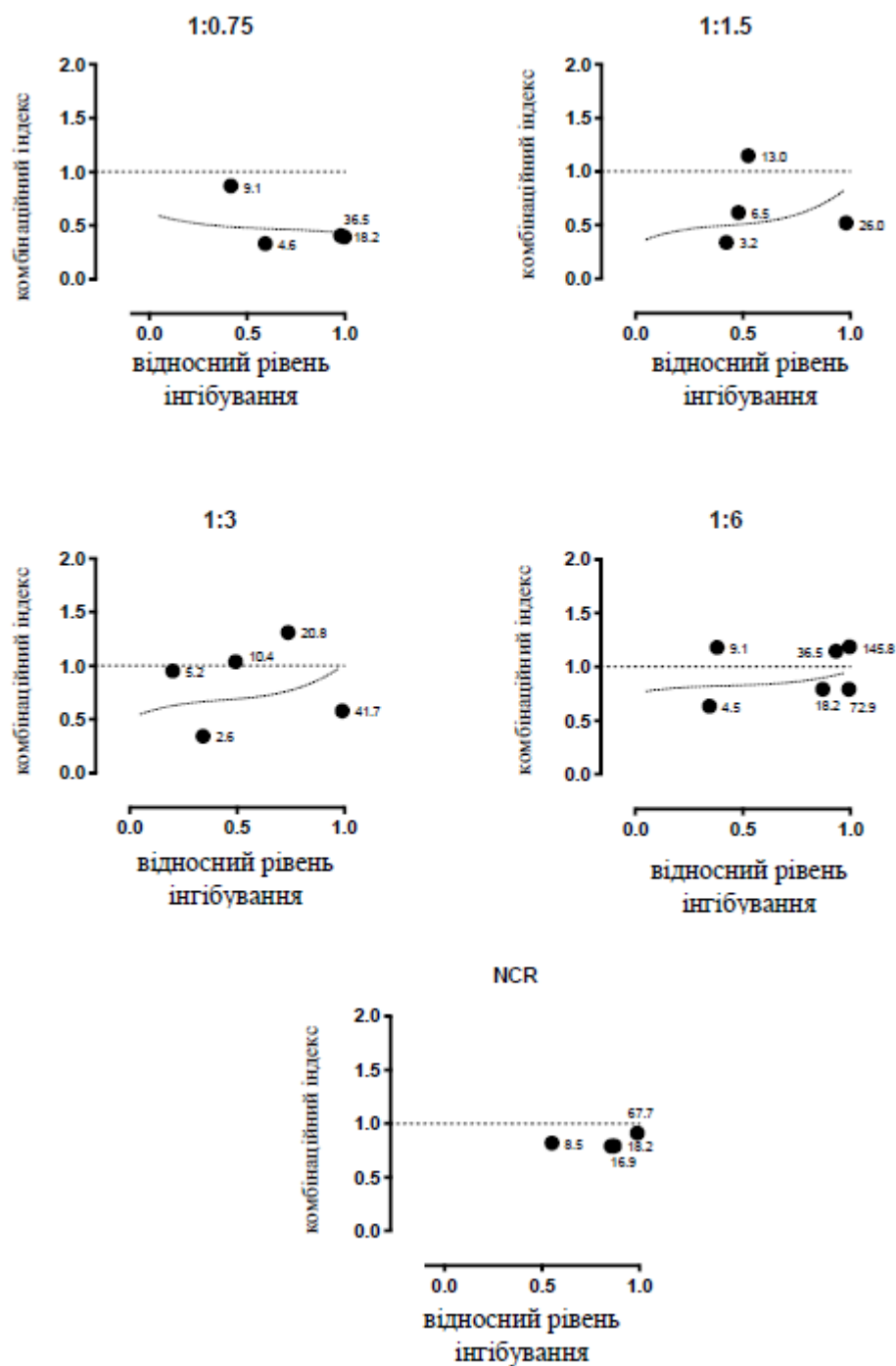
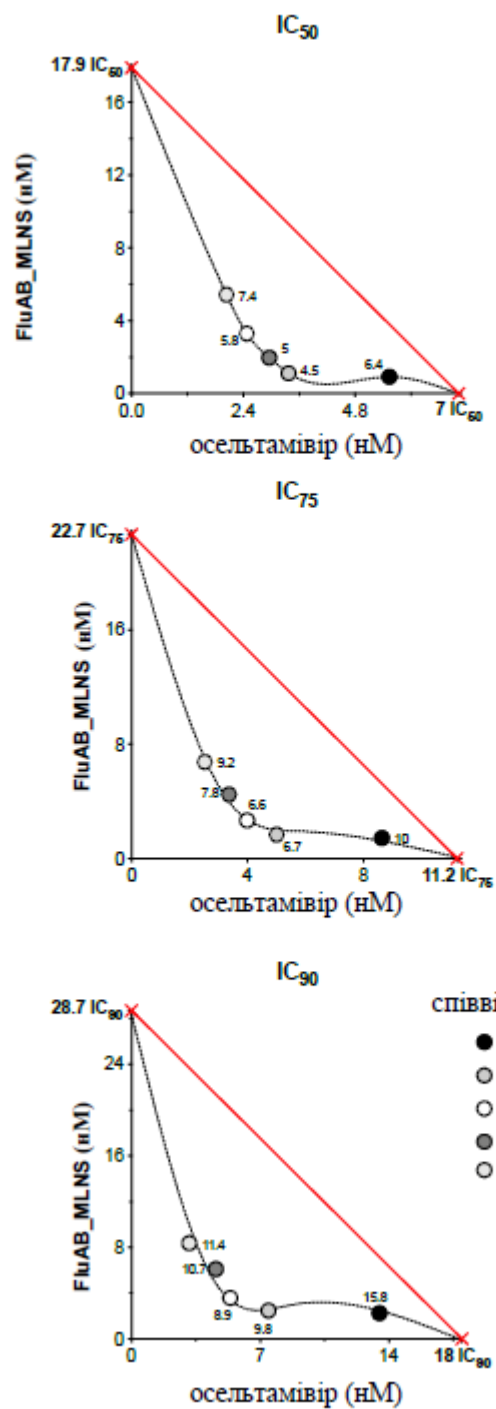


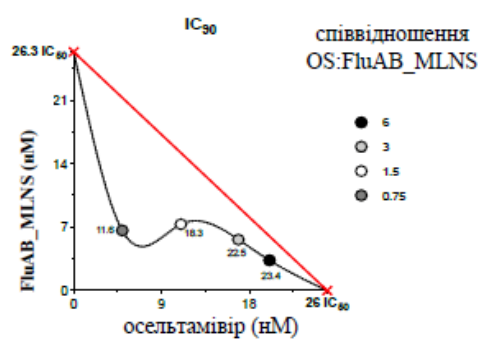
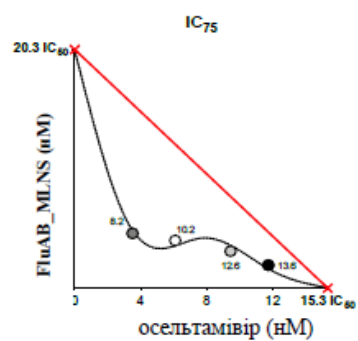
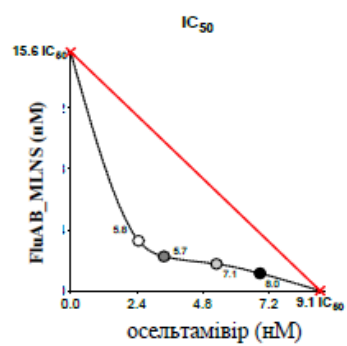
Fig. 12

H1N1

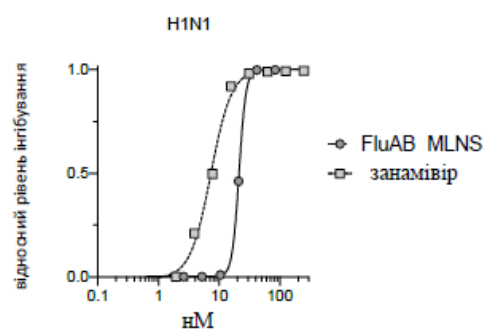
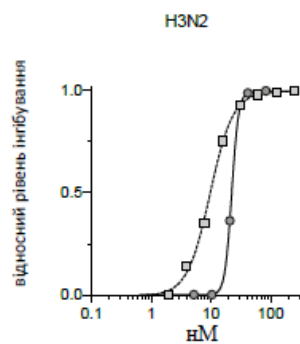
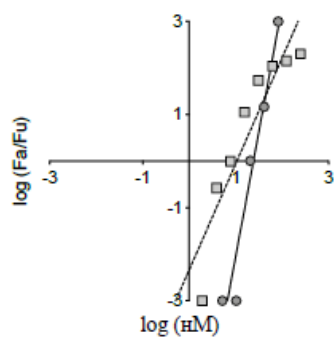
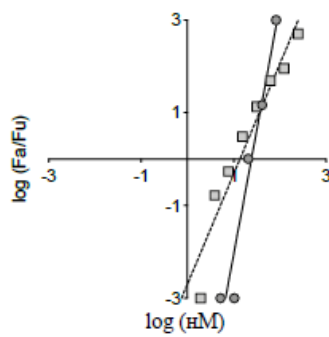


Фіг. 13

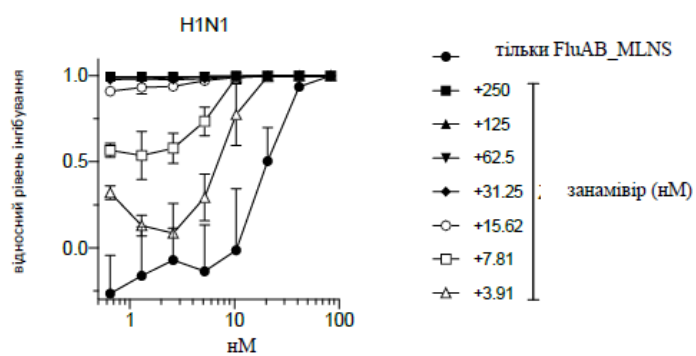
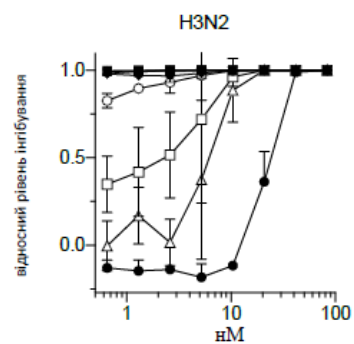
H3N2



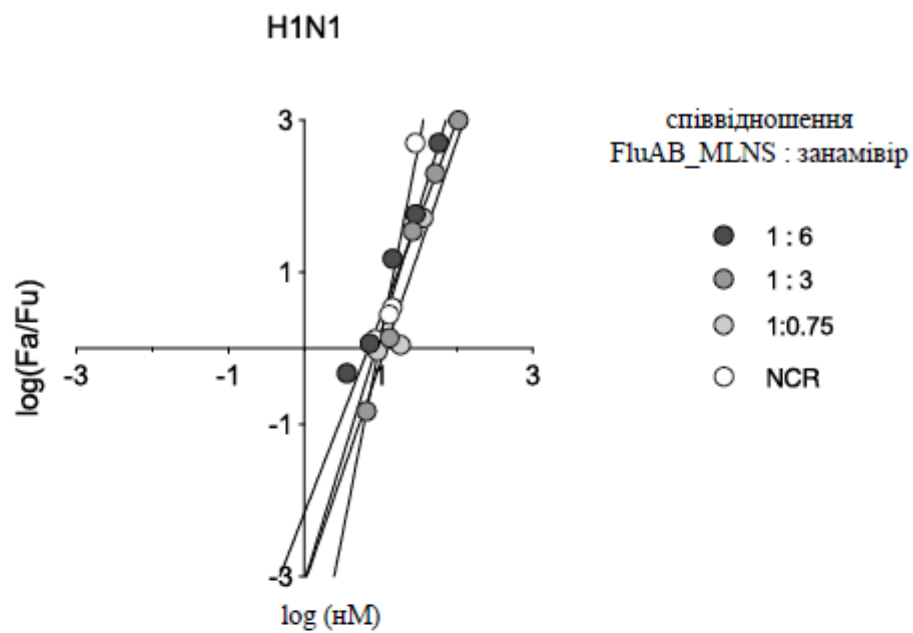
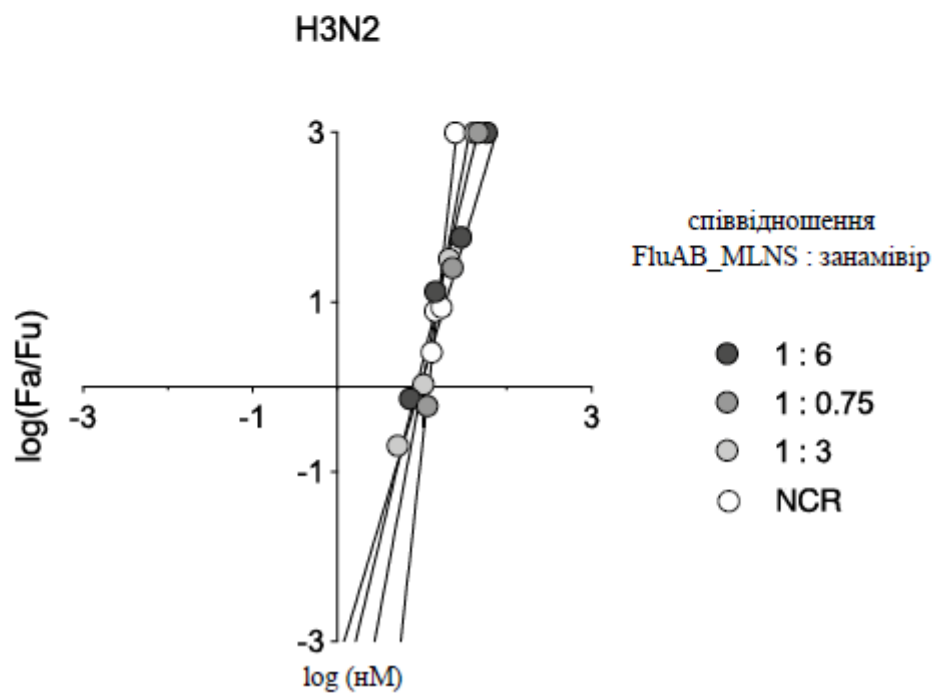
Фиг. 14

А**Б****В****Г**

Фіг. 15

А**Б**

Фіг. 16

A**Б****Fig. 17**

H1N1

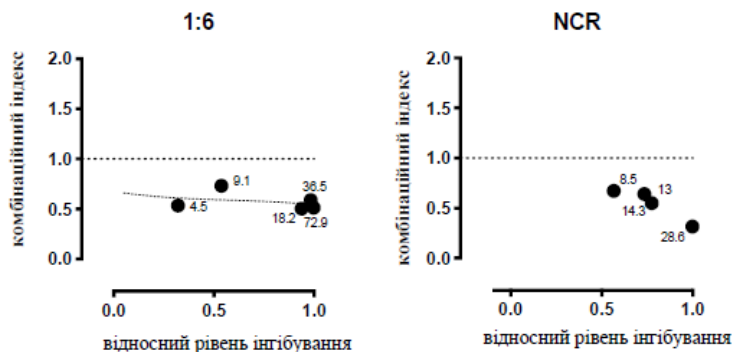
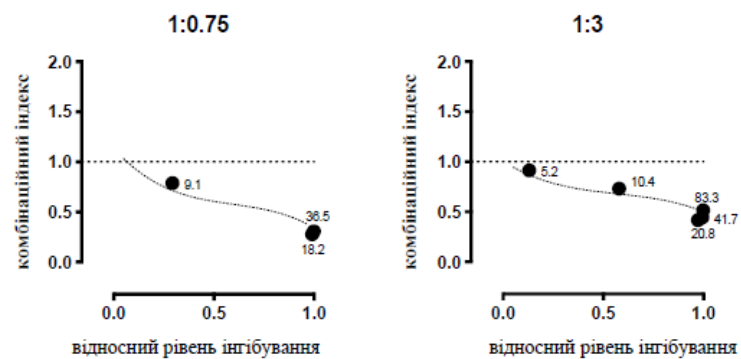


Fig. 18

H3N2

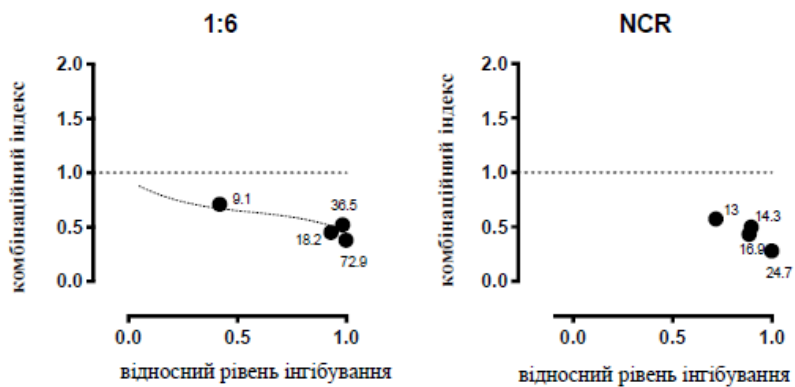
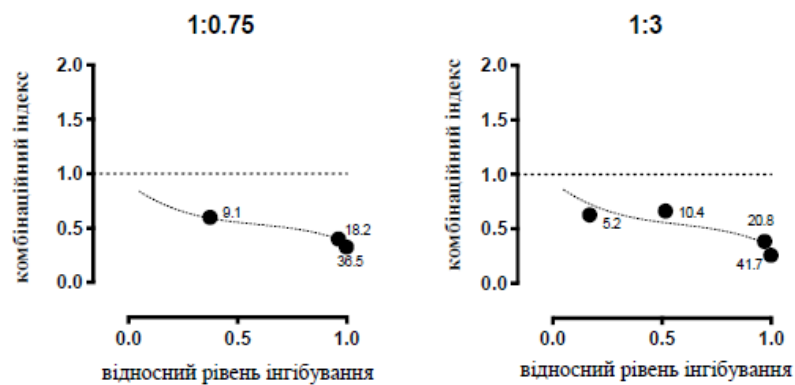
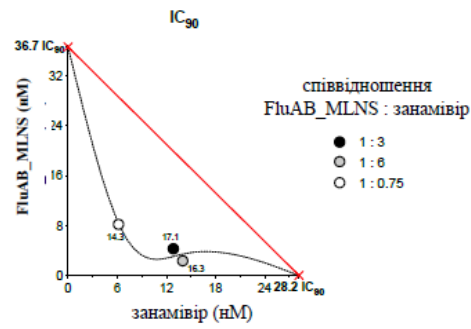
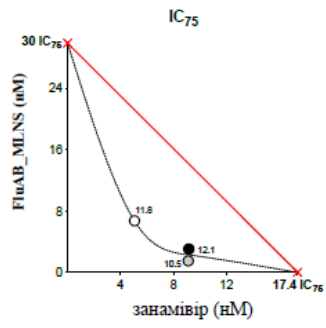
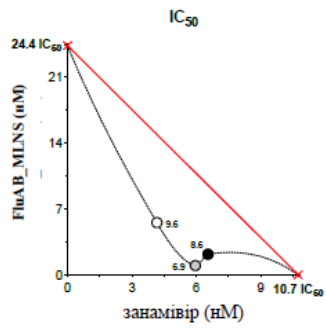


Fig. 19

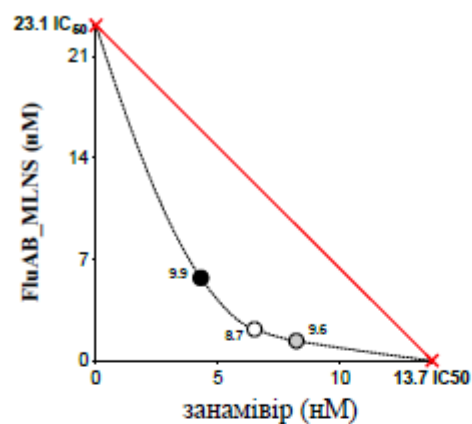
H1N1



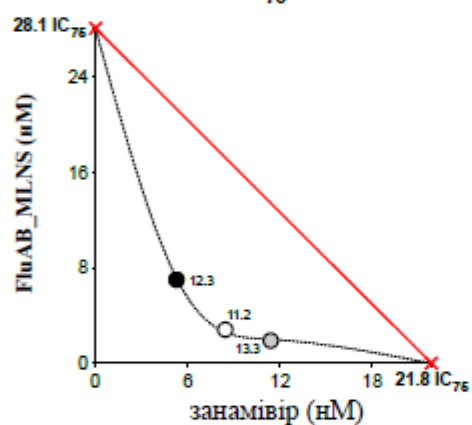
Фіг. 20

H3N2

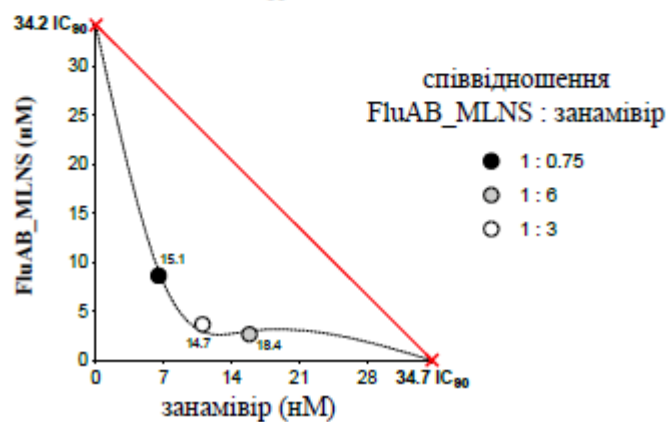
IC₅₀



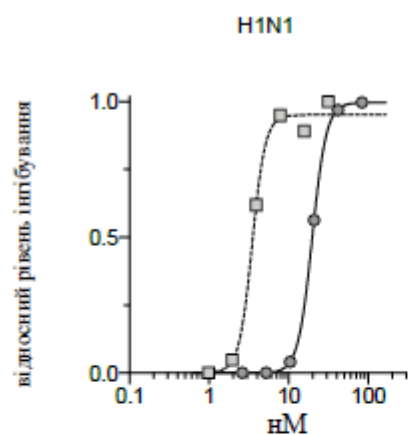
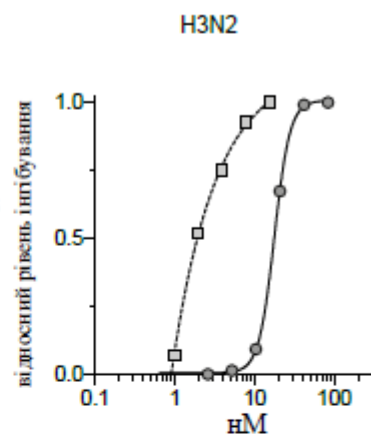
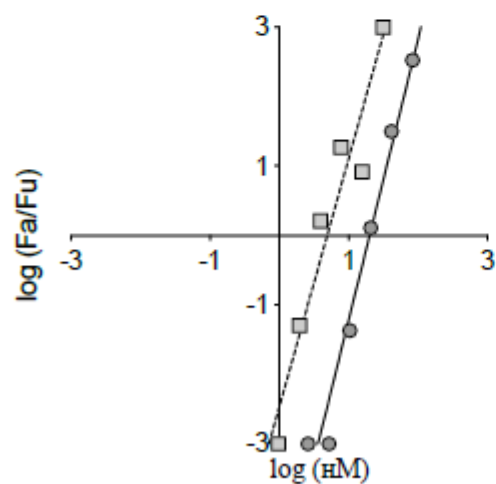
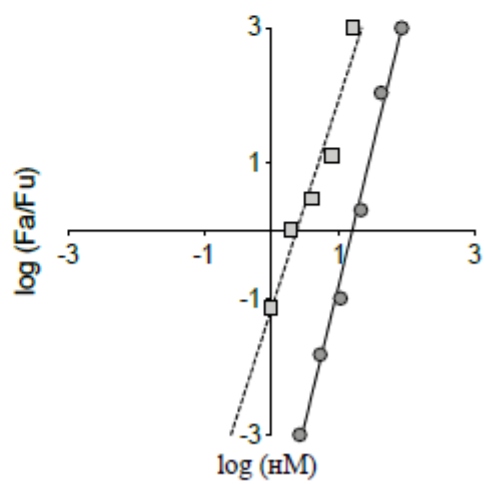
IC₇₅



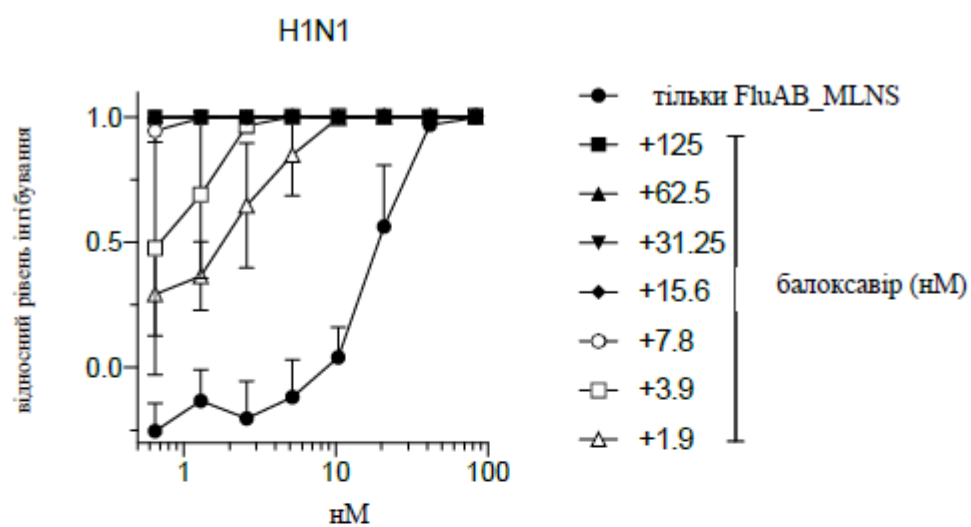
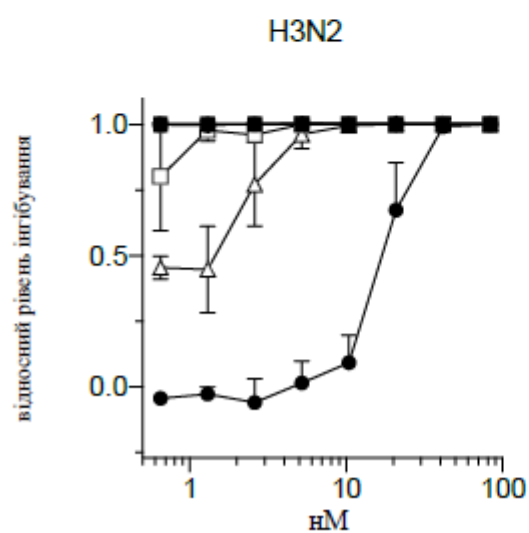
IC₉₀



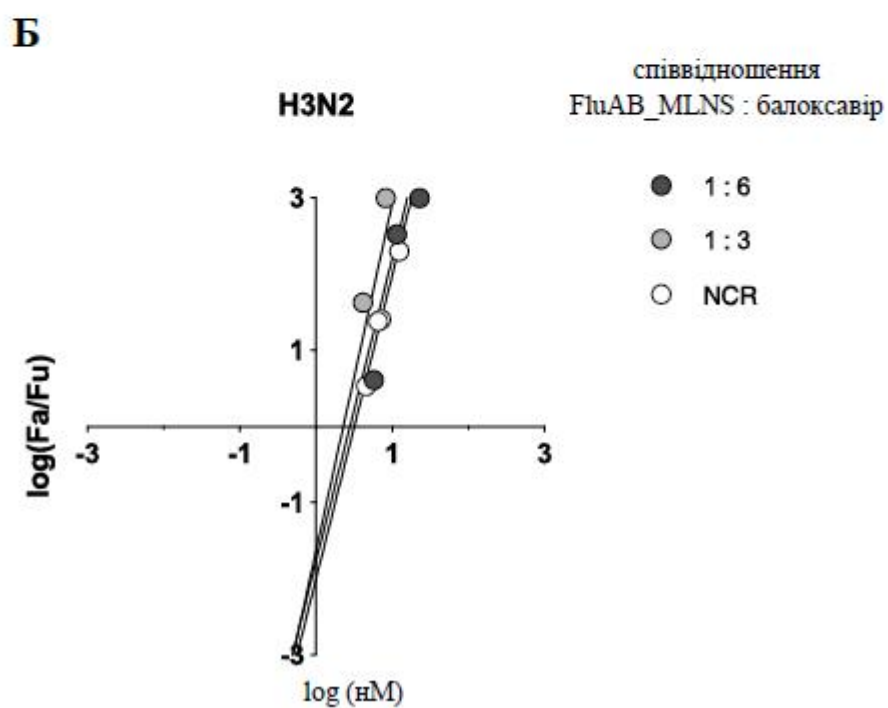
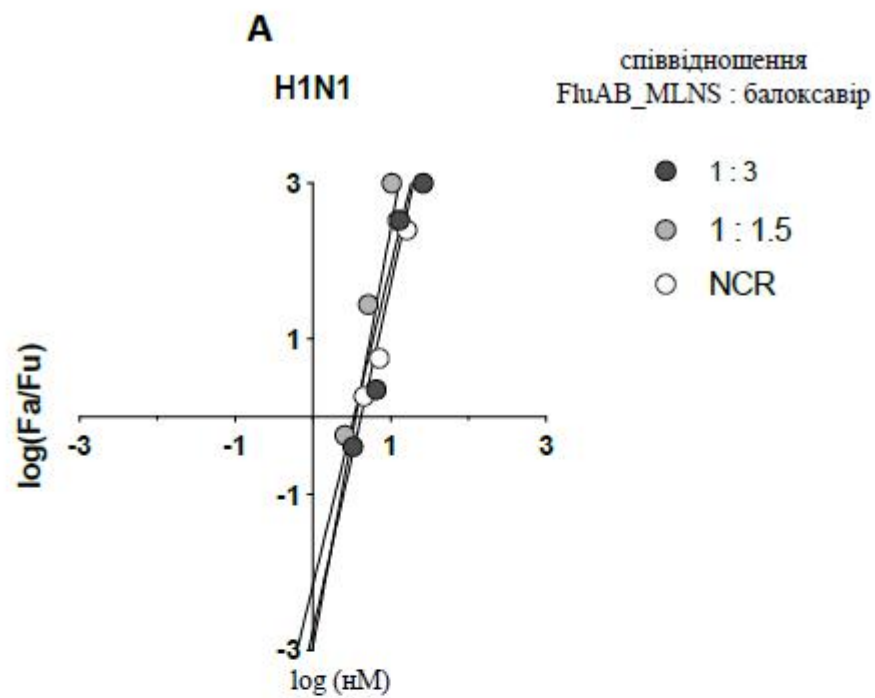
Фіг. 21

А**Б****В****Г**

Фиг. 22

A**Б**

Фіг. 23



Фиг. 24

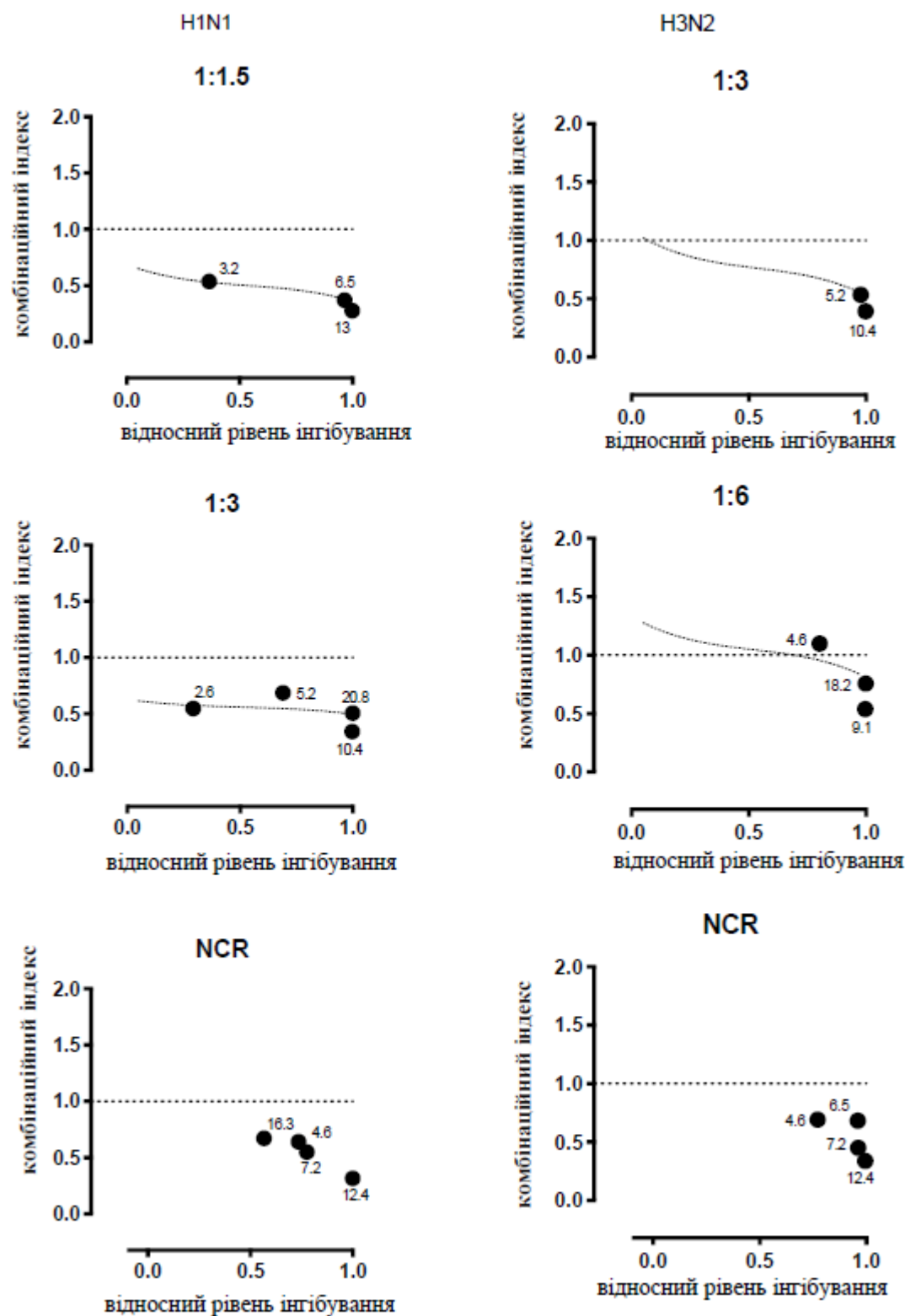
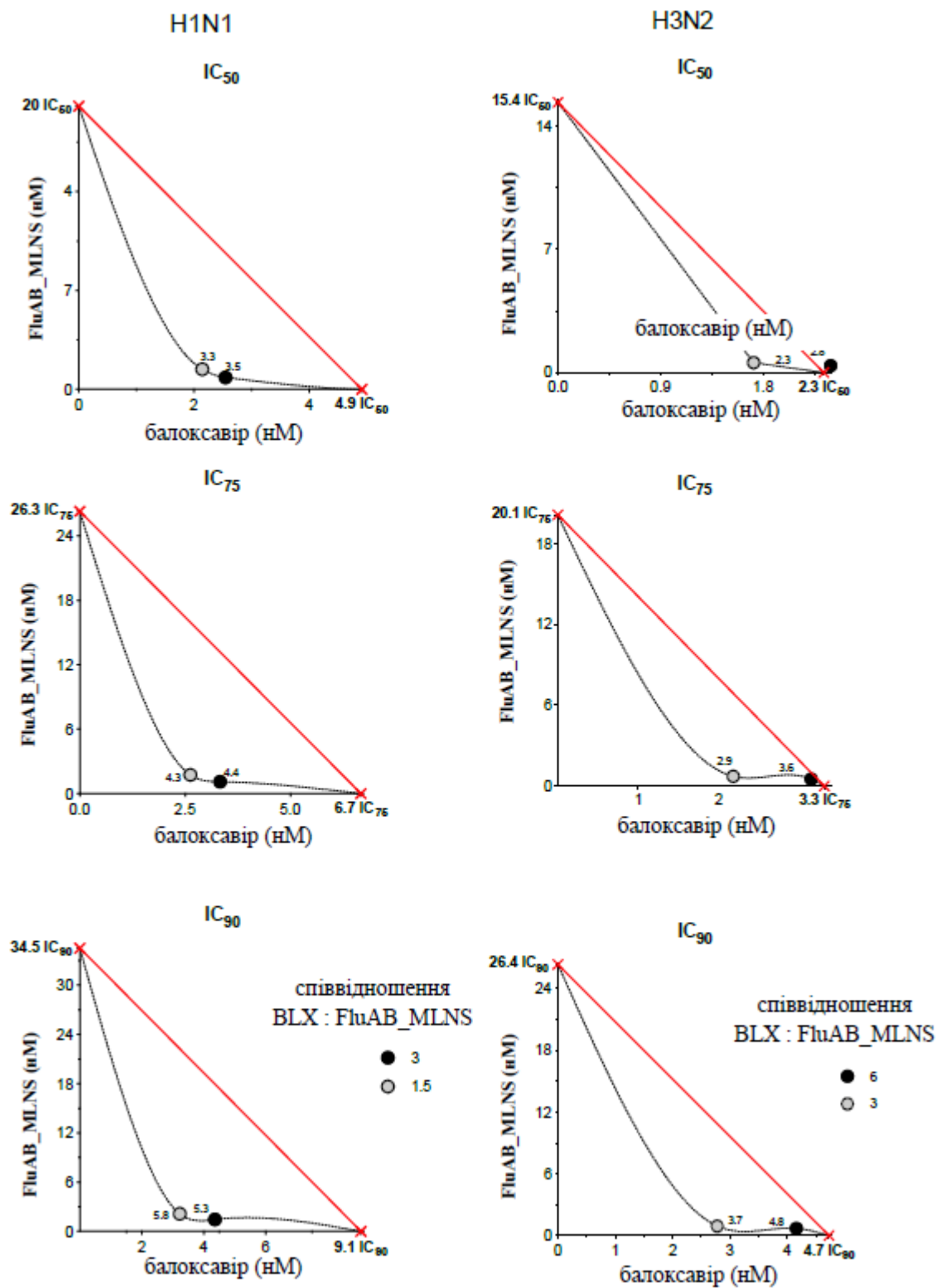
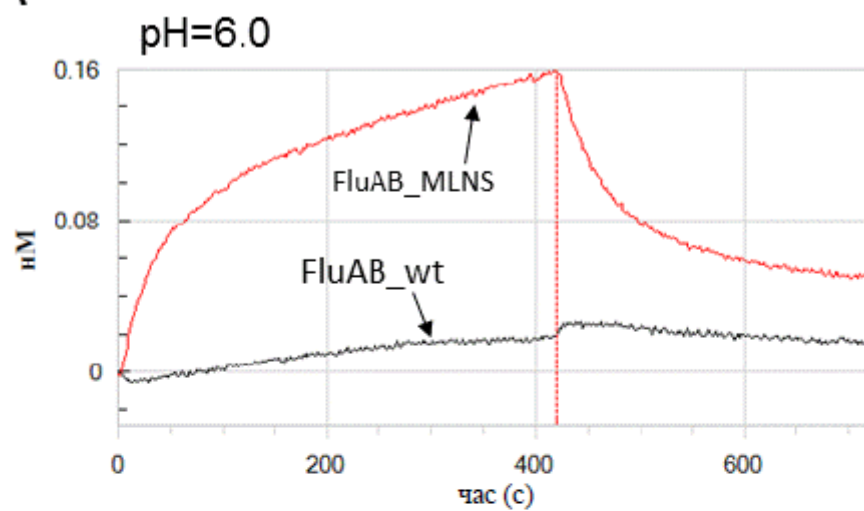


Fig. 25

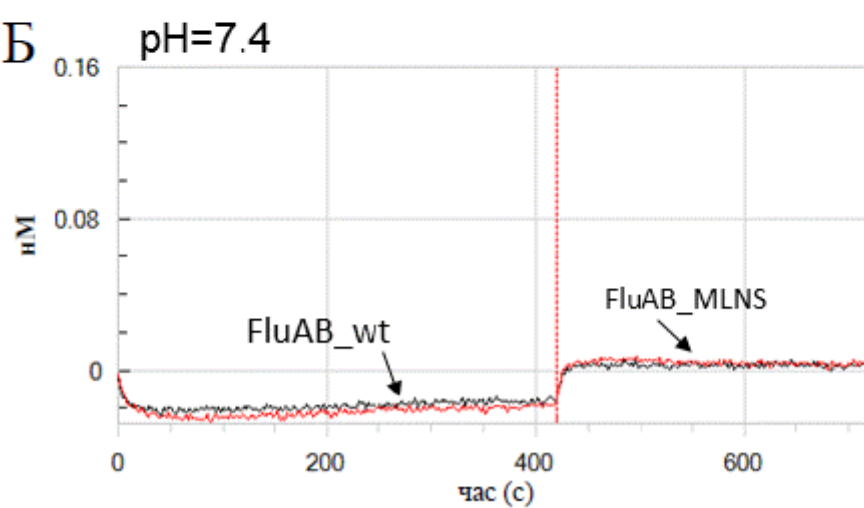


Фіг. 26

A

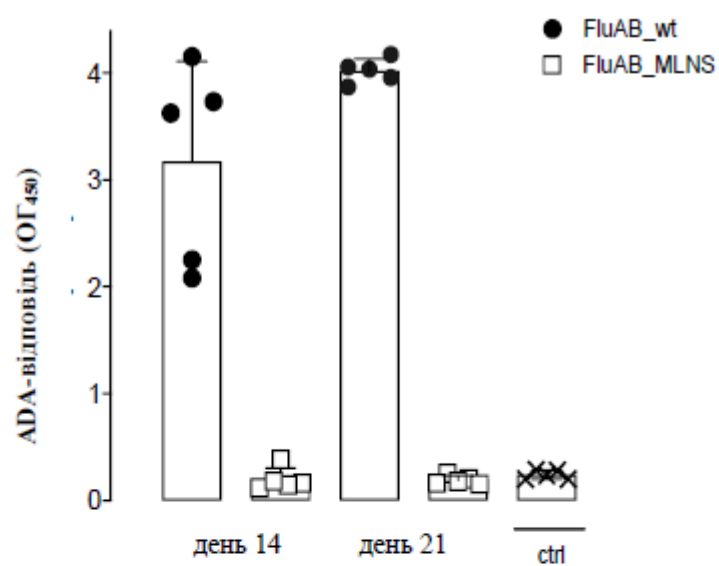


Б

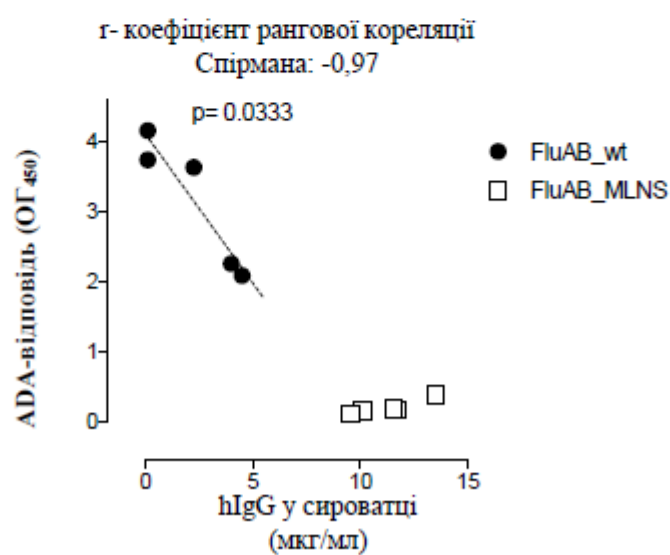


Фиг. 27

А



Б



Фіг. 28

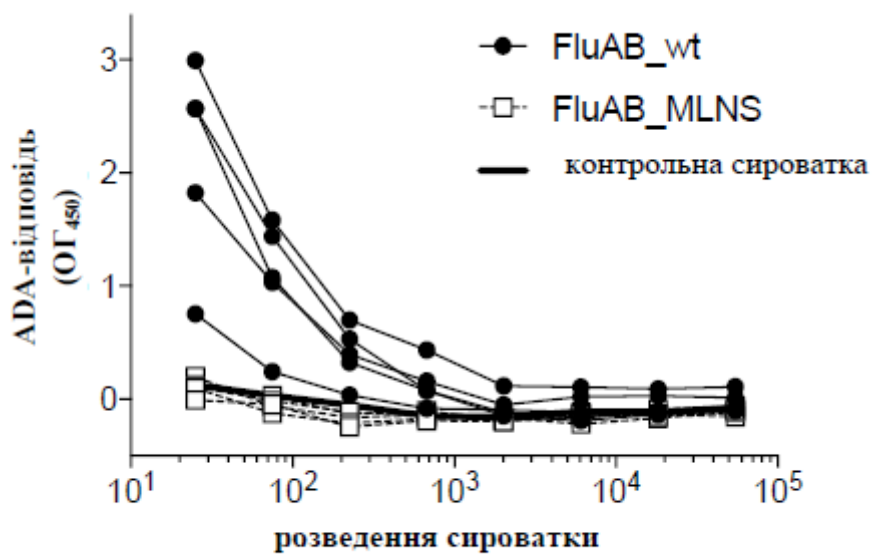


Fig. 29

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ХУМАБС БІОМЕД

<120> АНТИТІЛА ТА СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЇ, ЯКА ВИКЛИКАЄТЬСЯ ВІРУСОМ ГРИПУ А

<130> НВ01Р039W01

<150> РСТ/ЕР2019/061134

<151> 2019-04-30

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRH2

<400> 2

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRH3

<400> 3

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRL1

<400> 4

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRL2

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Thr
1 5

<210> 7
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val

100

105

110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 9

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FluAB_MLNS heavy chain

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
165 170 175

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
355 360 365

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 10
<211> 210
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> light chain

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
100 105 110

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
115 120 125

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
130 135 140

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
145 150 155 160

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
180 185 190

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
195 200 205

Glu Cys
210

<210> 11
<211> 458
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FluAB_wt heavy chain

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
165 170 175

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
355 360 365

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 12

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FluAB_MLNS VH nuc

<400> 12
caagttcagc tgcagcagag cggccccggt ctggtgaagc ctagccagac tctgtcttta 60
acttgcgcca tctccggcga cagcgtgagc agctacaacg ccgtctggaa ctggattcgt 120
cagagcccta gcagaggttt agagtggctg ggtcgtactt actatcgttc cggctggtac 180
aacgactacg ccgagagcgt gaagtctcgt atcactatca accccgatac tagcaagaac 240
cagttctctt tacagctgaa cagcgtgact cccgaagaca ctgccgtgta ctactgcgct 300
cgtagcggcc acatcactgt gttcggcgtg aatgtggacg ccttcgacat gtggggccaa 360
ggtactatgg tcactgtgag cagc 384

<210> 13
<211> 309
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FluAB_MLNS VL nuc

<400> 13
gacatccaga tgactcagag cccttcctct ttaagcgcta gcgtgggcga tagggtcact 60
atcacttgct gtactagcca gtctttaagc tctacactc actggtacca gcagaagccc 120
ggtaaggccc ctaagctgct gatctacgct gccagcagca gaggcagcgg agtgcctagc 180
agatttagcg gcagcggtag cggcactgac ttcactctga caatcagctc ttacagccc 240
gaagacttcg ccacttacta ctgccagcag tctcgtactt tcggccaagg tactaagggtg 300
gagatcaag 309

<210> 14
<211> 1374
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FluAB_MLNS heavy chain nuc

<400> 14
caagttcagc tgcagcagag cggccccggt ctggtgaagc ctagccagac tctgtcttta 60
acttgcgcca tctccggcga cagcgtgagc agctacaacg ccgtctggaa ctggattcgt 120
cagagcccta gcagaggttt agagtggctg ggtcgtactt actatcgttc cggctggtac 180

aacgactacg ccgagagcgt gaagtctcgt atcactatca accccgatac tagcaagaac	240
cagttctctt tacagctgaa cagcgtgact cccgaagaca ctgccgtgta ctactgcgct	300
cgtagcggcc acatcactgt gttcggcgtg aatgtggacg ctttcgacat gtggggccaa	360
ggtactatgg tcaactgtgag cagcgtagc accaagggcc catcgggtctt cccctggca	420
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac	480
ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc	540
ttcccggccg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc	600
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc	660
aaggtggaca agcgggttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	720
ccagcacctg aactcctggc gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac	780
accctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	840
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	900
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca	1020
ctccccgaag agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac	1080
accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	1140
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag	1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgctgcat	1320
gaggctctgc acagccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa	1374

<210> 15

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FluAB_MLNS light chain nuc

<400> 15

gacatccaga tgactcagag cccttctct ttaagcgcta gcgtgggcga tagggtcact	60
--	----

atcacttgct gtactagcca gtctttaagc tcctacactc actggtacca gcagaagccc	120
---	-----

ggtaaggccc ctaagctgct gatctacgct gccagcagca gaggcagcgg agtgcctagc	180
agatttagcg gcagcggtag cggcactgac ttcactctga caatcagctc tttacagccc	240
gaagacttcg ccacttacta ctgccagcag tctcgtactt tcggccaagg tactaagggtg	300
gagatcaagc gtacggtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag	360
ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc	420
aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca	480
gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca	540
gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc	600
gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt	630