

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
22 февраля 2018 (22.02.2018)



(10) Номер международной публикации
WO 2018/034597 A1

(51) Международная патентная классификация:

C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2017/050070

(22) Дата международной подачи:
03 августа 2017 (03.08.2017)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2016133720 17 августа 2016 (17.08.2016) RU

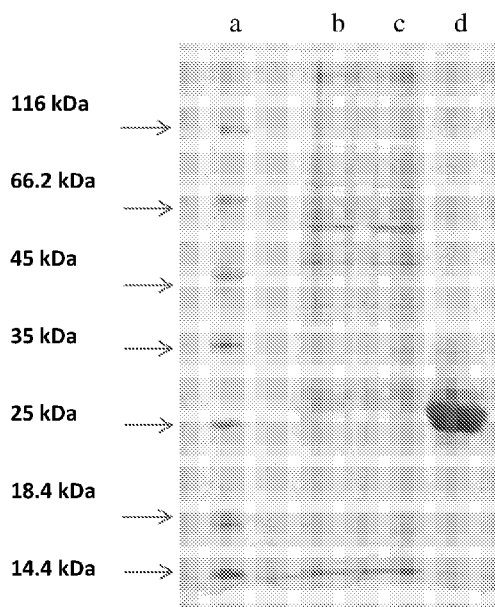
(71) Заявитель: ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕ-
СТВО "БИОКАД" (JOINT STOCK COMPANY
"BIOCAD") [RU/RU]; лит. А, д. 34, ул. Связи,

п. Стрельна, Петродворцовый район, Санкт-Петербург,
198515, St.Petersburg (RU).

(72) Изобретатели: ЕВДОКИМОВ, Станислав Рудоль-
фович (EVDOKIMOV, Stanislav Rudolfovich); Мик-
рорайон «Д», д. 20а, кв. 21, Московская обл., Пу-
щино, 142290, Pushchino (RU). УЛИТИН, Андрей
Борисович (ULITIN, Andrei Borisovich); Микрорай-
он «АБ», д. 28, кв. 11, Московская обл., Пущи-
но, 142290, Pushchino (RU). СОЛОВЬЕВ, Валерий
Владимирович (SOLOVYEV, Valery Vladimirovich);
Микрорайон «Д», д. 24, кв. 91, Московская обл.,
Пущино, 142290, Pushchino (RU). АЛЕКСАНДРОВ,
Алексей Александрович (ALEKSANDROV, Aleksei
Aleksandrovich); пр-кт Декабристов, 22, кв. 105 Пермь,
614095, Perm (RU). ЧЕРНЫХ, Юлия Сергеевна
(CHERNYKH, Yulia Sergeevna); ул. Молодежная,
д. 27, кв. 16, Пермский кр., Соликамск, 618553,

(54) Title: ANTIBODY OR AN ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF CAPABLE OF BINDING TO A HUMAN RECEPTOR OF INTERLEUKIN-6

(54) Название изобретения: АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, СПОСОБНЫЙ СВЯЗЫВАТЬСЯ С РЕЦЕПТОРОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ЧЕЛОВЕКА



Фиг. 3

(57) Abstract: The invention relates to medicine. The problem addressed by the present invention consists in creating alternative antibodies or fragments thereof which are capable of specifically binding to a human receptor of interleukin-6 and which would be useful as drugs for treating or diagnosing diseases, or for relieving symptoms, mediated by interleukin-6.

(57) Реферат: Изобретение относится к медицине. Задача настоящего изобретения состоит в создании альтернативных анти-тел или их фрагментов, обладающих способностью специфически связываться с человеческим рецептором интерлейкина-6, которые были бы применимы в качестве лекарственных средств для лечения или диагностики заболеваний или для облегчения симптомов, опосредованных интерлейкином-6.

[продолжение на следующей странице]



WO 2018/034597 A1

Solikamsk (RU). **НЕМАНКИН, Тимофей Александрович (NEMANKIN, Timofey Aleksandrovich)**; ул. Турбинная, д. 7, кв. 160, Санкт-Петербург, 198099, St.Petersburg (RU). **ВЛАДИМИРОВА, Анна Константиновна (VLADIMIROVA, Anna Konstantinovna)**; 2 линия, д. 15, кв. 31, Санкт-Петербург, 199004, St.Petersburg (RU). **СМОТРОВ, Олег Игоревич (SMOTROV, Oleg Igorevich)**; ул. Газовая, д. 30, Воронежская обл, Рамонский р-н, Рамонь, 396020, Ramon' (RU). **ЧЕРНОВСКАЯ, Татьяна Вениаминовна (CHERNOVSKAYA, Tatiana Veniaminovna)**; ул. Спортивная, 11, кв. 24, Московская обл., Чеховский р-н, п. Любучаны, 142380, p.Lyubuchany (RU). **МОЩЕНКО, Александр Александрович (MOSHCHENKO, Aleksandr Aleksandrovich)**; ул Гагарина, д. 112, кв. 25, Брянская обл., Клинцы, 243140, Klincy (RU). **НАЛОБИНА, Виктория Евгеньевна (NALOBINA, Viktoriia Evgenevna)**; ул. Моторостроителей, д. 73, кв. 42, Ярославская обл., Тутаев, 152303, Tutaev (RU). **ИВАНОВ, Роман Алексеевич (IVANOV, Roman Alekseevich)**; ул. Планетная, 29, корп. 2, кв. 176 Москва, 125167, Moscow (RU). **МОРОЗОВ, Дмитрий Валентинович (MOROZOV, Dmitry Valentinovich)**; пр-кт Ленинский, 35, кв. 54 Москва, 119071, Moscow (RU).

(81) **Указанные государства** (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Указанные государства** (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

- касающаяся установления личности изобретателя (правило 4.17 (i))
- касающаяся права заявителя подавать заявку на патент и получать его (правило 4.17 (ii))
- касающаяся права испрашивать приоритет предшествующей заявки (правило 4.17 (iii))
- об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)

**АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ
ФРАГМЕНТ, СПОСОБНЫЙ СВЯЗЫВАТЬСЯ С
РЕЦЕПТОРОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ЧЕЛОВЕКА
ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

5 Изобретение относится к медицине. Настоящее изобретение относится к созданию антител или их фрагментов, обладающих способностью специфически связываться с человеческим рецептором интерлейкина-6, которые были бы применимы в качестве лекарственных средств для лечения или диагностики заболеваний или для облегчения
10 симптомов, опосредованных интерлейкином-6. Изобретение также относится к способам получения указанных антител и способу лечения заболеваний человека с помощью данных антител.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

 Интерлейкин-6 (IL-6, ИЛ-6) является одним из главных посредников
15 воспалительных реакций, продуцируемый широким рядом антигенпрезентирующих клеток, включая В- и Т-клетки. IL-6 продуцируется активированными моноцитами или макрофагами, эндотелиальными клетками, фибробластами, активированными Т-клетками, а также рядом клеток, не являющихся иммунocyтaми. Наряду со многими другими
20 цитокинами он участвует в процессах иммунного ответа, ангиогенеза, воспаления, костного метаболизма. Основное действие IL-6 связано с его участием в качестве кофактора при дифференцировке В-лимфоцитов, их созревании и преобразовании в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины. Помимо этого, IL-6 способствует экспрессии рецептора
25 IL-6 на активированных иммунocyтaх, а также индуцирует производство IL-2 Т-клетками. Этот цитокин стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и реакции гемопоэза. По многообразию клеточных источников продукции и мишеней биологического действия IL-6 является одним из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и
30 воспалительной реакции. Было показано, что дисбаланс между про- и противовоспалительными действиями IL-6 приводит к различным аутоиммунным заболеваниям, хроническому воспалению и остеопорозу,

псориазу, а избыточная продукция приводит к различным формам рака.

В этой связи, блокирование действия IL-6 является привлекательной целью для исследований и лечения перечисленных заболеваний (PeterC.HeinrichBiochem. J. (2003) 374:1).

5 Проведение сигнала цитокина внутрь клетки возможно 2 способами. Первый - к клеткам, имеющим мембрансвязанную альфа-субъединицу рецептора, присоединяется интерлейкин-6 к уже собранному рецептору из альфа-субъединицы и молекул gp130. Второй - к клеткам, имеющим на мембране только молекулы gp130, присоединяется комплекс
10 интерлейкина-6 с растворимой формой альфа-субъединицы. На мембране клетки происходит сборка полного комплекса и последующий запуск каскада реакций в клетке. Блокирования действия цитокина и, следовательно, воспалительной реакции можно добиться, помешав сборке полного комплекса рецептора, состоящего из альфа-субъединицы,
15 молекул gp130 и интерлейкина 6. Специфические антитела, связываясь с одной из молекул, способны препятствовать сборке полного комплекса и, соответственно, блокируют проведение сигнала внутрь клетки.

Полипептиды, специфически связывающиеся с IL-6 (см. патент РФ № 2550262), IL-6R или gp130 показали значительное ингибирующее
20 влияние на функционирование IL-6. А препараты на основе антитела (тоцилизумаб) связывающегося с IL-6R и блокирующего взаимодействие с IL-6 широко применяются при лечении ревматоидного артрита и системного ювенильного идиопатического артрита, как в виде монотерапии, так и в комбинации с метотрексатом и/или с другими
25 базисными противовоспалительными препаратами.

Приведенные данные позволяют предположить, что разработка препарата на основе антитела анти-IL-6R позволит охватить лечением всех пациентов с данными заболеваниями.

Рецептор IL-6 (IL-6R, IL6R, CD126) является комплексом молекул,
30 при активации вызывающий каскад реакций в клетке, приводящих к активному синтезу белков, участвующих в дальнейших реакциях воспалительного ответа. Рецептор активируется при связывании IL-6 с

альфа-субъединицей рецептора массой 80 кДа, не передающей сигнала, и 2-ух молекул gp130 массой 130 кДа, передающих сигнал внутрь клетки (Simon A. Jones The FASEB Journal 15(1):43-58). Существуют 2 формы альфа-рецептора: связанного с мембраной (mIL-6R) и растворимого (sIL-6R 38 кДа). Растворимая форма образуется в результате протеолиза трансмембранной части или в процессе альтернативного сплайсинга мРНК mIL-6R. Растворимая форма IL-6sR позволяет давать ответ на цитокин клеткам, не имеющим mIL-6R на поверхности мембраны.

Блокирование сигнала IL-6 с помощью полипептидов, связывающихся с рецептором, имеет ряд преимуществ перед блокированием связывающихся непосредственно с IL-6. Так, антитела против IL-6 связываются как с целевым внутрисуставным лигандом, так и с циркулирующим в крови IL-6. В то время как антитела, связывающиеся с IL-6R действуют и на клетки, содержащие mIL-6R на поверхности, и на клетки, содержащие только gp130.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Определения

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области. Примерные способы и материалы описаны ниже, хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения могут также использоваться способы и материалы подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе. Все публикации и другие ссылочные материалы, упомянутые в настоящем документе, включены во всей их полноте путем отсылки. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, будет превалировать. Хотя в настоящем документе цитируется ряд документов, такое цитирование не является признанием того, что любой из этих документов образует часть общеизвестных знаний в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в

единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы клеточной и тканевой культуры, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

В этом описании и вариантах осуществления изобретения слова «иметь» и «содержать» или их вариации, такие как «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Если не указано иное, в настоящем тексте применяются общепринятые однобуквенные обозначения аминокислот.

Термины «интерлейкин-6», «ИЛ-6», «ИЛ6», «IL6» и «IL-6» в настоящем тексте используются взаимозаменяемо.

Термин «IL-6R», «IL6R» или CD126 обозначает рецептор интерлейкина-6.

Термин «sIL-6R» обозначает растворимую форму рецептора интерлейкина-6.

Термин «mIL-6R» обозначает связанный с мембраной рецептор интерлейкина-6.

Термин «антитело» и «иммуноглобулин» являются взаимозаменяемыми и относятся к полноразмерному антителу в том виде, в каком они синтезируются клетками иммунной системы или иными организмами, модифицированными средствами генной инженерии.

Полноразмерные антитела состоят из четырех полипептидных цепей:

двух тяжелых цепей (H)(приблизительно 50-70 кД при полной длине)

и

двух легких цепей (L) (приблизительно 25 кД при полной длине), связанных между собой дисульфидными мостиками.

5 N-концевая (аминоконцевая) часть каждой цепи включает переменный участок из приблизительно 100-110 или более аминокислот, которые в основном отвечают за распознавание антигенов.

10 C-концевая (карбоксиконцевая) часть каждой цепи определяет константный участок, главным образом, отвечающий за функцию эффектора.

Вариабельные участки тяжелых и легких цепей образуют антигенсвязывающий центр (или участок).

15 Легкие цепи антител классифицируют как каппа или лямбда, каждая из которых имеет конкретный константный участок. Каждая легкая цепь состоит из переменного участка N-концевой части легкой цепи («LCVR» или «VL») и константного участка легкой цепи, состоящего из одного домена CL.

20 Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и они определяют изотип антитела, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Каждый тип тяжелой цепи характеризуется конкретным константным участком, Fc. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка N-концевой тяжелой цепи («HCVR» или «VH») и константного участка тяжелой цепи CH. Константный участок тяжелой цепи состоит из

25 трех доменов (CH1, CH2 и CH3) для IgG, IgD и IgA и 4 доменов (CH1, CH2, CH3 и CH4) для IgM и IgE.

30 Участки HCVR и LCVR могут быть дополнительно разделены на участки гипервариабельности, называемые Rf-гипервариабельными участками (CDR), перемежающиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR).

Каждый HCVR и LCVR состоит из трех CDR и четырех FR,

расположенных в следующем порядке от аминоконца к карбоксиконцу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном.

5 Вариабельные участки каждой из пар легкая/тяжелая цепь образуют антигенсвязывающие сайты антитела. Как используется в данной заявке, «антигенсвязывающая часть», или «антигенсвязывающий участок», или «антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающий центр» относятся, взаимозаменяемо, к такой части молекулы антитела, которая
10 содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном и придающие антителу его специфичность и аффинность по отношению к антигену. Эта часть антитела включает «каркасные» аминокислотные остатки, необходимые для поддержания надлежащей конформации антигенсвязывающих остатков.

15 Под «антителом» в настоящей заявке не обязательно понимается антитело человека, это может быть антитело грызуна, антитело животного семейства приматов или Camelidae, предпочтительно антитело мыши, макаки, антитело верблюда или ламы, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

20 Термин «антитело» в настоящем тексте также охватывает искусственно сконструированные одноцепочечные антитела, имеющие структуру, близкую к структуре натуральных антител.

Антитела, упоминаемые в настоящем тексте, могут быть гликолизированными или свободными от полисахаридных остатков.

25 Под антителом по изобретению может пониматься моноклональное антитело. Под «моноклональным антителом» понимается гомогенная или по существу гомогенная популяции антител (т.е. по крайней мере приблизительно 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 %, более предпочтительно по
30 крайней мере приблизительно 97 или 98 % или еще более предпочтительно по крайней мере 99 % антител в популяции будут конкурировать в анализе ELISA за тот же антиген или эпитоп, или более предпочтительно антитела являются идентичными в аминокислотной

последовательности).

Также под моноклональными антителами понимаются антитела имеющие идентичную или по существу идентичную аминокислотную последовательность, хотя они могут отличаться по посттрансляционной модификации, например паттернгликолизации.

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены с использованием, например, гибридомных методик, хорошо известных из уровня техники, а также рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий или комбинаций таких технологий или других технологий, хорошо известных из уровня техники.

Однако, термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными только с помощью гибридомной технологии. Этот термин может относиться к антителу, полученному из единой копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон.

Нумерацию аминокислотных остатков в настоящем тексте осуществляют со ссылкой на референсное антитело, под которым понимается антитело, тяжелые цепи которого имеют последовательность SEQIDNO:10, а легкие цепи – последовательность SEQIDNO:9. Во всех остальных случаях нумерацию и позиционирование CDR-аминокислотных остатков в пределах HCVR и LCVR участков антител осуществляют в соответствии с номенклатурой Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), если не указано иное.

Антитела согласно изобретению могут быть получены различными методиками конструирования, в том числе, с использованием рекомбинантных способов, включая шаффлинг ДНК, полученной из различных источников.

Антитела настоящего изобретения могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфичны по отношению к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать

антиген-связывающие домены, специфические по отношению к иному одному или нескольким антигенам, помимо IL-6R или к разным эпитопам IL-6R (см., например, Tuttetal. (1991) J. Immunol. 147:60-69).

Связи между антигенсвязывающими частями моно-, би- и мультиспецифичных антител могут быть различными. В частности, связи между антигенсвязывающими частями могут быть химическими, либо разные антигенсвязывающие части могут быть объединены через общую полипептидную цепь, либо путем нековалентной ассоциации разных цепей друг с другом, либо антигенсвязывающие части могут быть объединены друг с другом посредством другого антитела или фрагмента антитела.

Термин «анти-sIL-6R-антитело», «антитело к sIL-6R», «антитело, специфически связывающееся с рецептором интерлейкина-6» и т. п. являются взаимозаменяемы в контексте настоящей заявки и относятся к антителу, которое специфически связывается с рецептором IL-6. Термин «mIL-6R» обозначает связанный с мембраной рецептор интерлейкина-6.

Термин «sIL-6R» обозначает растворимую форму рецептора интерлейкина-6.

Под «фрагментом антитела» понимается любой фрагмент натурального и искусственно сконструированного антитела, содержащий три или менее CDR тяжелой и три или менее CDR легкой цепи. Под фрагментом антитела может подразумеваться, в частности, по существу полноразмерное антитело, с укороченным каркасным участком тяжелой цепи, полный или полноразмерный Fc-участок, часть или фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую часть, например, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент антитела, scFv, (scFv)₂, dsFv, одноцепочечный Fv-фрагмент, который может быть получен путем связывания ДНК, кодирующей LCVR и HCVR, с линкерной последовательностью (см. Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315, 1994).

Термин «фрагмент антитела» не должен пониматься, как указывающий на происхождение от полноразмерного антитела. «Фрагмент

антитела» может быть получен совершенно независимо от полноразмерных антител любым известным способом.

Под «фрагментом антитела» также подразумевается искусственно сконструированный полипептид или продукт, содержащий пептидные и непептидные части, если в его состав входят упомянутые три или менее CDR тяжелой и три или менее CDR легкой цепи, расположенные таким образом, что полипептид или упомянутый продукт сохраняют способность специфического или предпочтительного связывания своей мишени (например, эпитопа или антигена).

Все остальное, сказанное выше применительно к антителам, в том числе, то, что касается гликозилирования, также применимо и к фрагментам антител, если это не противоречит здравому смыслу.

Термин «специфически связывает», что используется в данной заявке, относится к той ситуации, при которой один участник пары специфического связывания не связывает в значительной степени молекулы, отличные от его партнера (партнеров) по специфическому связыванию. Термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен антитела по изобретению является специфическим для конкретного эпитопа, который переносится рядом антигенов, в таком случае специфическое антитело, имеющее антигенсвязывающий домен, будет способно к специфическому связыванию различных антигенов, несущих эпитоп. Соответственно, антитело по изобретению или его фрагмент специфически связывает sIL-6R человека, в то время как оно практически не связывается с человеческими белками IL12, IL23, EGFR, CD3, IGFR, CTGF, FGF2, PD1, PSCK9, CD38, GCSF, интерферон альфа 2b.

Термин «эпитоп» относится к той части молекулы, которая способна распознаваться и связываться с антителом в одном или более антигенсвязывающих участках антитела. Эпитопы часто состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими

зарядовыми характеристиками. Под «ингибирующим эпитопом» и/или «нейтрализующим эпитопом» подразумевается эпитоп, который в контексте интактной антигенной молекулы и при связывании антителом, специфическим к эпитопу, приводит к утрате или к уменьшению биологической активности молекулы или организма, который содержит молекулу, *invivo* или *invitro*. Термин «эпитоп», как используется в данной заявке, кроме того, относится к части полипептида, которая обладает антигенной и/или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно млекопитающего, например мыши или человека. Термин «антигенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, с которой может специфически связываться антитело, определенная любым способом, хорошо известным из уровня техники, например при помощи традиционного иммунного анализа. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными, но могут также быть иммуногенными. «Иммуногенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, который вызывает отклик антитела у животного, что устанавливается любым способом, известным из уровня техники. «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» содержат несмежные полипептиды (или аминокислоты) в пределах антигенного протеина, с которым антитело, специфическое к эпитопу, связывается.

Выражения «биологическое свойство» или «биологическая характеристика» или термины «активность» или «биоактивность» по отношению к антителу по изобретению используются в данной заявке как взаимозаменяемые и включают, но не ограничиваются приведенными, эпитоп/антигенную аффинность и специфичность к sIL-6R, способность быть антагонистом IL-6, стабильность антитела и иммуногенные свойства антитела *invivo*. Остальные идентифицируемые из уровня техники биологические свойства или характеристики антитела включают, например, перекрестную реактивность (т.е. с нечеловеческими гомологами пептида-мишени или с остальными протеинами или мишенями, в общем), и способность сохранять высокие уровни экспрессии

протеина в клетках млекопитающих. Вышеуказанные свойства или характеристики могут наблюдаться, измеряться или оцениваться с использованием методик, признанных в уровне техники, включая, но не ограничиваясь приведенными, анализ ELISA, конкурентный анализ ELISA, или анализ поверхностного плазмонного резонанса KINEXA, анализы нейтрализации *invitro* или *invivo* без ограничений, рецепторного связывания, продуцирования и/или секреции цитокина или фактора роста, сигнальную трансдукцию и иммуногистохимию срезов тканей, полученных из различных источников, включая человека, примата или любой другой источник.

Термин «ингибировать» или «нейтрализовать», как используется в данной заявке, по отношению к активности антитела по изобретению, означает способность в значительной степени противодействовать, препятствовать, предотвращать, ограничивать, замедлять, прерывать, уничтожать, прекращать, уменьшать или обращать, например, развитие или тяжесть того, что ингибируют, включая, но не ограничиваясь вышеприведенными, биологическую активность (например, активность IL-6) или свойство, заболевание или состояние. Ингибирование или нейтрализация активности IL-6 в результате связывания антитела по изобретению с sIL-6R составляет предпочтительно по крайней мере приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше.

Термин «пациент» в данной заявке относится к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь приведенными, мышей, обезьян, людей, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих спортивных животных и млекопитающих комнатных животных; предпочтительно термин относится к людям. В определенном из вариантов осуществления пациент, предпочтительно млекопитающее, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется заболеванием или расстройством, или состоянием, опосредованными IL-6, которые могут быть улучшены путем уменьшения биоактивности IL-6.

Термин «вектор» включает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она

связана, включая плазмиды и вирусные векторы, но не ограничиваясь ими. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены, в то время как остальные векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и, таким образом, реплицированы наряду с геномом-хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы имеют в данной заявке название «векторы рекомбинантной экспрессии» (или, упрощенно, «векторы экспрессии»), а иллюстративные векторы хорошо известны из уровня техники.

Как используется в данной заявке, выражения «клетка», «клетка-хозяин», «линия клеток» и «клеточная культура», «клеточная линия как продуцент» используются как взаимозаменяемые и включают индивидуальную клетку или клеточную культуру, являющиеся реципиентом любого выделенного полинуклеотида по изобретению или любого рекомбинантного вектора (любых рекомбинантных векторов), которые содержат последовательность, кодирующую HCVR, LCVR или моноклональное антитело по изобретению. Клетки-хозяева включают потомство индивидуальной клетки-хозяина, и потомство не обязательно должно быть полностью идентичным (по морфологии или полному ДНК комплементу) оригинальной родительской клетке из-за природных, случайных или преднамеренных мутаций и/или изменений. Клетка-хозяин включает клетки, трансформированные, трансдуцированные или инфицированные рекомбинантным вектором, или моноклональное антитело, которое экспрессирует полинуклеотид по изобретению или его легкую или тяжелую цепь. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантный вектор по изобретению (как стабильно включенный в хромосом-хозяин, так и не включенный), также может называться «рекомбинантной клеткой-хозяином». Предпочтительными клетками-хозяевами для использования в изобретении являются CHO клетки (например, ATCC CRL-9096), NS0 клетки, SP2/0 клетки, COS клетки (ATCC, например, CRL-1650, CRL-1651) и HeLa (ATCC CCL-2). Дополнительные

клетки-хозяева для использования в изобретении включают растительные клетки, дрожжевые клетки, другие клетки млекопитающих и прокариотные клетки.

Термин «аффинность» относится к измерению притяжения между антигеном и связывающей молекулой, например, антителом. Внутренняя способность к притяжению связывающей молекулы по отношению к антигену, как правило, выражается как константа равновесия аффинности связывания (KD) конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Считается, что связывающая молекула специфически связываться с антигеном, когда KD составляет ≤ 1 мМ, предпочтительно ≤ 100 нМ. AKD константа связывания аффинности может быть измерена, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или биослойной интерферометрии, например, с использованием системы ProteOn™ XPR36 SPR от Bio-Rad или системы Octet™.

Термин «Ka», как использовано в данном описании, относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «Kd» относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин «KD» в данном описании относится к константе аффинности, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka), и ее выражают в виде молярной концентрации (M). Величины KD для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо установленных в данной области.

Предпочтительным способом определения KD антитела является способ с использованием резонанса поверхностных плазмонов, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Как использовано в данном описании, термин «высокая аффинность» в отношении IgG-антитела относится к антителу, имеющему KD - E-10 - E-08 M, более предпочтительно E-10 - E-09 M или менее и, даже более предпочтительно, E-10 M или менее в отношении антигена-мишени. Однако «высокая аффинность» связывания может варьироваться для других изотипов антигена. Например, «высокая аффинность» связывания

для изотипа IgM относится к антителу, имеющему KD E-10 - E-07 M или менее, более предпочтительно E-10 - E-08 M или менее, даже более предпочтительно E-10 - E-09 M или менее.

Термин « K_{off} » относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Константу скорости диссоциации k_{off} можно измерить посредством биослойной интерферометрии, например, с помощью системы Octet™.

Термин «эпитоп» при использовании в данном документе относится к части (детерминанте) антигена, который специфически связывается со связывающей молекулой (например, антитело или родственная молекула, такие как биспецифичная связывающая молекула). Эпитопные детерминанты обычно состоят из молекул, таких как аминокислоты или углеводы, или боковые цепи сахаров, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики зарядов. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». В линейном эпитопе, все точки взаимодействия между белком (например, антиген) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) происходит линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе, точки взаимодействия происходят через аминокислотные остатки на белке, отделенные друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. Когда желаемый эпитоп антигена определен, можно генерировать антитела к этому эпитопу с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Кроме того, генерация и характеристика антител или других связывающих молекул могут пролить свет на информацию о желательных эпитопах. Основываясь на этой информации, можно затем конкурентно скринировать связывающие молекулы для связывания с теми же или аналогичными эпитопами, например, путем проведения исследований конкуренции, чтобы найти связывающие молекулы, которые конкурируют за связывание с антигеном. Термин «эпитоп», как используется в данной заявке, кроме того, относится к части полипептида, которая обладает антигенной и/или иммуногенной

активностью у животного, предпочтительно млекопитающего, например мыши или человека. Термин «антигенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, с которой может специфически связываться антитело, определенная любым способом, хорошо известным из уровня техники, например, при помощи традиционного иммунного анализа.

Можно определить, связывается ли антитело или другая связывающая молекула с тем же эпитопом или перекрестно конкурирует за связывание с IL-6 связывающей молекулой по данному изобретению, используя хорошо известные в данной области техники методы. В одном варианте осуществления изобретения возможно связывание молекулы, предложенной в данном изобретении, с IL-6 в условиях насыщения с последующим измерением способности испытуемого антитела связываться с указанным антигеном-мишенью. Если испытуемое антитело способно связываться с антигеном-мишенью в одно время с референсной связывающей молекулой, то испытуемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа референсной связывающей молекулы. Тем не менее, если испытуемое антитело не способно связываться с антигеном-мишенью одновременно, то испытуемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связанного с связывающей молекулой. Этот эксперимент может быть выполнен с использованием ИФА, РИА, анализа межмолекулярных взаимодействий на BIACORE™, биослойной интерферометрии или проточной цитометрии. Для того, чтобы проверить, кросс конкурирует ли связывающая молекула по данному изобретению с другой связывающей молекулой, можно использовать описанный выше способ конкурентного анализа в двух направлениях, то есть определить, блокирует ли известная связывающая молекула испытуемую связывающую молекулу, и наоборот. Такие эксперименты по перекрестной конкуренции могут быть выполнены, например, с помощью прибора IBIS MX96 SPR или системы Octet™.

В одном варианте осуществления изобретения связывающая

молекула, предложенная в данном изобретении, представляет собой моноклональное антитело. Используемое в данном документе сокращение «mAb» относится к моноклональному антителу, то есть антителу, которое синтезировано и выделено отдельной клональной популяцией клеток. Клональная популяция может быть клональной популяцией иммортализованных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммортализованные клетки в клональной популяции являются гибридными клетками, гибридами, которые обычно получают путем слияния отдельных В-лимфоцитов от иммунизированных животных с отдельными клетками лимфоцитарной опухоли. Гибридомы представляют собой тип сконструированных клеток и не встречаются в природе.

Класс (изотип) и подкласс антител может быть определен любым способом, известным в данной области техники. В целом, класс и подкласс антитела может быть определен с помощью антител, специфичных к конкретному классу и подклассу антител. Такие антитела коммерчески доступны. Класс и подкласс может быть определен с помощью ИФА, вестерн-блот анализа, а также другими методами. В другом варианте класс и подкласс может быть определен посредством секвенирования всех или части константных доменов тяжелой и/или легкой цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов и определения класса и подкласса антител.

Термин «идентичность» или «гомологичность» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот, относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия. Сравнение идентичности последовательности может проходить на участке длиной по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 18 нуклеотидов, чаще по меньшей мере около 24 нуклеотида, типично по меньшей мере около 28 нуклеотидов, более типично по меньшей мере

около 32 нуклеотидов, и предпочтительно по меньшей мере около 36, 48 или более нуклеотидов. Существует целый ряд различных алгоритмов, известных в данной области, которые могут быть использованы для измерения идентичности нуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнить с использованием FASTA, Gap или BESTFIT, которые являются программами в Wisconsin Package версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, штат Висконсин. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательности в областях наилучшего покрытия между запрашиваемой и искомой последовательностями (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132: 185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266: 227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276: 71-84 (1998)). Если не указано иное, используются параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательности между последовательностями нуклеиновых кислот может быть определен с использованием FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и фактора NOPAM для балльной матрицы) или с использованием Gap с параметрами по умолчанию, как это предусмотрено в GCG версии 6.1.

Термин «гомологичный», что касается полипептидной последовательности антитела, следует толковать как антитело, проявляющее по крайней мере, 70%-ную, предпочтительно 80%-ную, более предпочтительно 90%-ную и наиболее предпочтительно 95%-ную идентичность последовательности относительно полипептидной последовательности. Термин в отношении последовательности нуклеиновой кислоты следует толковать как последовательность нуклеотидов, проявляющих, по крайней мере, 85%-ную, предпочтительно 90%-ную, более предпочтительно 95%-ную и наиболее предпочтительно 97%-ную идентичность последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты.

Выражение «биспецифическое антитело» или

«мультиспецифическое антитело» включает антитело, способное селективно связывать два или более эпитопа. Биспецифические антитела, например, могут включать две различных антиген-связывающих части, где указанные антиген-связывающие части специфически связывают разные эпитопы или на различных молекулах (например, антигенах), или на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два различных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой антиген-связывающей части для первого эпитопа, как правило будет по меньшей мере от одного до двух, или трех, или четырех порядков ниже, чем аффинность первой антиген-связывающей части для второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут представлять собой одну и ту же или различную мишень (например, на одном и том же или различном белке). Биспецифические антитела можно получать, например, комбинированием тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы на одном и том же антигене. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими различные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности можно экспрессировать в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, где каждая имеет три CDR тяжелой цепи, с последующим (от N-конца до С-конца) доменом CH1, шарнирной областью, доменом CH2 и доменом CH3, и легкой цепью иммуноглобулина, которая или не наделена антигенсвязывающей специфичностью, но может объединяться с каждой из тяжелой цепей, или может объединяться с каждой из тяжелых цепей и может связывать один или несколько эпитопов, ограниченных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или может объединяться с каждой из тяжелых цепей и способствует связыванию или одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

2. Задача

Задача настоящего изобретения состоит в создании антител или их фрагментов, обладающих способностью специфически связываться с человеческим рецептором интерлейкина-6, которые были бы применимы в качестве лекарственных средств для лечения или диагностики заболеваний или для облегчения симптомов, опосредованных интерлейкином-6.

3. Антитела по изобретению и их фрагменты

В соответствии с настоящим изобретением предлагается антитело или его антиген-связывающий фрагмент, в которых способность связываться с рецептором интерлейкина-6 (IL-6) человека обеспечивается за счет того, что оно содержит в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые содержат в себе:

- последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO:9, и

- последовательность вариабельного домена легкой цепи, по меньшей мере на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO:10.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий фрагмент конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий

фрагмент по меньшей мере на 90% гомологичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В одном варианте осуществления настоящее изобретение связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется тем, что оно относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его фрагмент имеет последовательность тяжелой цепи, гомологичную не менее чем на 90% последовательности SEQ ID NO 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его фрагмент имеет последовательность легкой цепи, гомологичную не менее чем на 90% последовательности SEQ ID NO 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc константная часть IgG1 изотипа содержит мутации E233P, L234A, L235A, E236P, L237V и/или L238A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc константная часть IgG1 изотипа содержит мутации, увеличивающие значение фармакинетических параметров в животном или человеке, такие как $t_{1/2\beta}$ (час) или C_{max} (мкг/мл).

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc константная часть IgG1 изотипа содержит мутации M255Y, S257T и/или T259E, увеличивающие значение фармакокинетических параметров в животном или человеке, такие как $t_{1/2\beta}$ (час) или C_{max} (мкг/мл).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют по меньшей мере одно из следующих свойств:

а) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и хранении при $T = 4^\circ \text{C}$ в течение более чем 6 месяцев содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5 % от исходного содержания в растворе;

б) имеет такую агрегационную стабильность, что при

концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до 37° С в течение более чем 2 недель содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5 % от исходного содержания в растворе.

с) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и повышении температуры до 50° С в течение более чем 24 часов содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5 % от исходного содержания в растворе;

d) имеет константу аффинности KD с рецептором IL-6 человека не более E-10 - E-09 M;

е) имеет кинетическую константу ассоциации $k_{on}(1/Ms)$ с рецептором IL-6 человека не менее E+05 (1/Mc);

f) имеет кинетическую константу диссоциации $k_{dis} (1/s)$ с рецептором IL-6 человека не более E-04 (1/c).

g) демонстрирует антипролиферативную активность на культуре интерлейкин-6 зависимых клеток DS1 с расчетной величиной IC50 не более 10^{-8} M.

h) демонстрирует блокирование STAT-3 сигналинга на культуре интерлейкин-6 зависимых клеток с расчетной величиной IC50 не более 10^{-8} M.

3. Биспецифические антитела по изобретению

В соответствии с настоящим изобретением также предлагается биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий фрагмент вышеописанного антитела.

Примером такого антитела может быть биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающие части, CDR которых отличаются друг от друга и имеют суммарную гомологию выше 95 % друг к другу.

4. ДНК

В соответствии с настоящим изобретением также предлагается ДНК, предназначенная для получения вышеописанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающая последовательности, соответствующие последовательностям упомянутых CDR.

5. Экспрессионный вектор

В соответствии с настоящим изобретением также предлагается экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько вышеописанных ДНК.

Для экспрессии могут быть использованы системы, описанные в разделе 6.2 «НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ» международной публикации WO 2010/148223 (см. аналог - патент РФ 2567639).

6. Клеточная линия

В соответствии с настоящим изобретением также предлагается клеточная линия, содержащая в клетках вышеописанный вектор или вышеописанную ДНК.

7. Способ получения антитела

В соответствии с настоящим изобретением предлагается способ получения вышеописанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование вышеописанной клеточной линии в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

8. Фармацевтическая композиция

В соответствии с настоящим изобретением предлагается фармацевтическая композиция для терапии заболевания или состояния, связанного с действием интерлейкина-6 (IL-6), или для устранения или облегчения симптома, связанного с нежелательным воздействием IL-6, содержащая эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по пункту 1 или по любому из пунктов, подчиненных пункту 1, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

Предпочтительно, когда композиция по пункту представляет собой раствор для парентерального введения.

Альтернативно, композиция по пункту может представлять собой

лиофилизированный порошок.

Композиция по пункту может быть предназначена для использования в терапии и/или в диагностике заболевания выбранного из следующего группы заболеваний и/или расстройств: ревматоидный артрит, остеоартрит, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артрит Лайма, псориатический артрит, реактивный артрит, спондилоартропатия, системная красная волчанка, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, инсулинзависимый сахарный диабет, тиреоидит, астма, аллергическое заболевание, псориаз, атопический дерматит, склеродермия, реакция «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата органа, острое или хроническое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органа, саркоидоз, болезнь Кавасаки, болезнь Грэйвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпура Шенлейна-Геноха, микроскопический васкулит почек, хронический активный гепатит, увенит, септический шок, синдром токсического шока, септический синдром, кахексия, синдром приобретенного иммунодефицита, острый поперечный миелит, хорея Гентингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный билиарный цирроз, гемолитическая анемия, взрослый (острый) респираторный дистресс-синдром, алоpecia, очаговая алоpecia, серонегативная артропатия, артропатия, болезни Рейтера, псориатическая артропатия, связанная с язвенным колитом артропатии, атопическая аллергия, аутоиммунное буллезное заболевание, пемфигус обыкновенный, листовидный пемфигус, пемфигоид, болезнь линейных IgA, аутоиммунная гемолитическая анемия, Кумбс-положительная гемолитическая анемия, приобретенная пернициозная анемия, ювенильная пернициозная анемия, артериит, первичный склерозирующий гепатит, криптогенный аутоиммунный гепатит, фиброзное заболевание легких, криптогенный фиброзный альвеолит, пост-воспалительное интерстициальное заболевание легких, интерстициальный пневмонит, хроническая эозинофильная пневмония, постинфекционное

интерстициальное заболевание легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит I типа (классический аутоиммунный или люпоидный гепатит), аутоиммунный гепатит II типа, остеоартроз, первичный склерозирующий холангит, псориаз I типа, 5 псориаз II типа, идиопатическая лейкопения, аутоиммунная нейтропения, NOS-болезнь почек, гломерулонефрит, микроскопический васкулит почек, дискоидная красная волчанка, идиопатическая или NOS-мужского бесплодия, аутоиммунитет к сперматозоидам, рассеянный склероз (все подтипы), симпатическая офтальмия, легочная гипертензия, вторичная 10 для болезни соединительной ткани, синдром Гудпасчера, легочное проявление узелкового полиартериита, острая ревматическая атака, ревматоидный спондилит, болезнь Стилла, системная склеродермия, синдром Шенгрена, болезнь/артериит Такаясу, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопения, аутоиммунное 15 заболевание щитовидной железы, гипертиреозидизм, зубный аутоиммунный гипотиреоз (болезнь Хашимото), атрофический аутоиммунный гипотиреоз, первичная микседема, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острое заболевание печени, хроническое заболевание печени, аллергия и астма, психическое 20 расстройство (включая депрессию и шизофрению), опосредуемое типом Th2 и типом Th1 заболеваний, конъюнктивита, аллергический контактный дерматит, аллергический ринит, дефицит альфа-1-антитрипсина, боковой амиотрофический склероз, анемия, кистозный фиброз, нарушения, связанные с цитокиновой терапией, демиелинизирующие заболевания, 25 дерматит, иридоциклит, увеит, оптический неврит, повреждения при ишемии-реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунное преждевременное угасание функции яичников и 30 блефарит.

Антитела по изобретению могут быть введены отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем

и/или наполнителем в однократных или многократных дозах. Фармацевтические композиции для введения разработаны таким образом, чтобы соответствовать выбранному режиму введения, а фармацевтически приемлемые разбавители, носители и/или наполнители, такие как диспергирующие агенты, буферы, поверхностноактивные вещества, консерванты, солюбилизирующие агенты, изотонические агенты, стабилизаторы, криопротекторы выбраны с учетом придания композиции необходимой лекарственной формы. Указанные композиции разработаны в соответствии с традиционными методами, приведенными в, например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, где описаны различные методы получения композиций, в общем известных специалистам.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент по изобретению, может быть введена пациенту с использованием стандартных методов введения, включая пероральное, внутривенное, интраперитонеальное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное или при помощи суппозитория.

Фармацевтическая композиция по изобретению содержит эффективное количество антитела по изобретению. Под «эффективным количеством» понимается количество, эффективное при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимого для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, и способности антитела или части антитела вызывать желательную реакцию у индивидуума. Эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезный эффект антитела преобладает над токсическим или вредным эффектом. Если антитело используют в профилактических целях, то под «эффективным количеством» понимается количество, эффективное при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимых для достижения

желательного профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу используют для индивидуумов до или на ранней стадии заболевания, то, типично, профилактически эффективное количество может быть меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Эффективное количество представляет собой, по крайней мере, минимальную дозу, но меньшую, чем токсическая доза активного агента, необходимую для обеспечения терапевтического или профилактического эффекта у пациента. С другой стороны, эффективное количество антитела по изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, снижает биологическую активность IL-6.

Путь введения антитела по изобретению может быть пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Предпочтительно антитела по изобретению могут быть включены в фармацевтическую композицию, пригодную для парентерального введения. Термин «парентеральный» включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или интраперитонеальное введение. Преимущественным является введение путем внутривенной или интраперитонеальной, или подкожной инъекции. Подходящие носители для таких инъекций непосредственно известны из уровня техники.

Фармацевтическая композиция, как указано в соответствующих руководствах, должна быть стерильной и стабильной в условиях производства и хранения в контейнере, который обеспечивается, включая, например, герметично закрытый флакон (ампула) или шприц. Поэтому фармацевтические композиции могут быть стерильно профильтрованными после получения состава либо сделаны микробиологически пригодными иным образом. Типичная композиция для внутривенной инфузии может иметь объем в 250-1000 мл жидкости, такой как стерильный раствор Рингера, физиологический раствор, раствор декстрозы и раствор Хенка, и терапевтически эффективную дозу (например, 1-100 мг/мл или более) концентрации антитела. Доза может

варьировать в зависимости от вида и тяжести заболевания. Как хорошо известно из уровня техники в области медицины, дозировки для любого из пациентов зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, 5 предназначенное для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, которые вводят одновременно. Типичная доза может находиться, например, в диапазоне 0,001-1000 мкг; однако, предвидятся дозы, находящиеся ниже или выше этого иллюстративного диапазона, особенно учитывая вышеуказанные факторы. Режим дозирования ежедневного парентерального введения 10 может составлять от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг от общей массы тела, предпочтительно от 0,3 мкг/кг до 10 мг/кг и более предпочтительно от 1 мкг/кг до 1 мг/кг, даже более предпочтительно от 0,5 до 10 мг/кг массы тела в день. Процесс лечения можно контролировать путем периодической 15 оценки состояния пациента. Для повторного введения в течение нескольких дней или дольше в зависимости от состояния пациента лечение повторяют до достижения желаемого ответа или подавления симптомов болезни. Однако также могут применяться другие режимы дозирования, которые не описаны в данной заявке. Желаемая дозировка 20 может быть введена путем однократного введения, множественных болюсных введений или путем непрерывного инфузионного введения антитела в зависимости от образца фармакокинетического распада, которого хочет достигнуть практикующий специалист.

Эти предположительные количества антитела в сильной степени 25 зависят от решения терапевта. Ключевым фактором выбора соответствующей дозы и режима является желаемый результат. Факторы, рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное молокопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место введения 30 антитела, конкретный вид антитела, способ введения, режим введения и остальные факторы, известные практикующим специалистам-медикам.

Антитела или их фрагменты могут быть заморожены либо

лиофилизированы и восстановлены перед применением в подходящем стерильном носителе. Лиофилизирование и восстановление могут приводить к различным степеням потери активности антитела. Дозировки могут быть скорректированы для компенсации этой потери. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 6 до 8.

9. Готовые изделия

В другом из вариантов осуществления по изобретению обеспечивается готовое изделие, содержащее материалы, полезные для лечения или профилактики расстройств или состояний, описанных выше.

Готовое изделие содержит контейнер, содержащий фармацевтическую композицию с антителом, с обозначением и возможно инструкцию. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и аналитические пробирки. Контейнеры могут быть сделаны из ряда материалов, таких как стекло или полимерный материал. Контейнер содержит композицию согласно изобретению, которая является эффективной для лечения заболевания или нарушения, опосредованного IL-6, и может иметь выход со стерильным доступом (например, контейнер может быть пакетом для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, проницаемую для гиподермальной иглы для инъекций). Активный агент в композиции является анти-IL-6R-антителом согласно изобретению. Обозначение на контейнере и инструкция, присоединенная к нему, указывает на то, что композицию применяют для лечения выбранного заболевания. Готовое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрана. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

10. Применение

В соответствии с настоящим изобретением предлагается применение вышеописанного антитела или его фрагмента для изготовления лекарственного средства.

5 Предпочтительно, когда упомянутое лекарственное средство предназначено для использования в терапии и/или в диагностике заболеваний, перечисленных выше в качестве назначения фармацевтической композиции.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

10 Фиг. 1 — Гель-электрофорез в денатурирующих условиях наработанного и очищенного sIL-6R человека в 12 % PAGE.

Дорожки a-d: Fermentas unstained marker, IL6R-H6F культуральная жидкость до нанесения на колонку 10 мкл, IL6R-H6F культуральная жидкость после нанесения на колонку 10 мкл, IL6R-H6F элюция 5 мкл.

15 Фиг. 2 — Вестернблот анализ наработанного и очищенного sIL-6R человека. После проведения гель электрофореза в денатурирующих условиях sIL-6R человека в 12 % PAGE и переноса на мембрану, провели связывание с тоцилизумабом, а далее анти-GoatahIgGlgG HRP. Окраску провели с помощью ДАБ. Дорожки a-b: Prestained marker, IL6R-flag-his 5
20 мкл.

Фиг. 3 — Гель-электрофорез в денатурирующих условиях наработанного и очищенного IL6-H6-EPEA человека (с 6 гистидинами и EPEA последовательностью на С-конце белка) в 12 % PAGE.

Дорожки a-d: Fermentas unstained PW marker, IL6-H6-EPEA кж до
25 нанесения на колонку 5 мкл, IL6-H6-EPEA кж после нанесения на колонку 5 мкл, IL6-H6-EPEA элюция с колонки 5 мкл.

Фиг. 4 — Фагмида для клонирования Fab фаговых дисплейных библиотек.

Фиг. 5 — Экспрессионная плазмида для клонирования и наработки
30 Fab.

Фиг. 6 — Кинетики ассоциации и диссоциации Fab-фрагментов с альфа-субъединицей IL-6R человека на ForteBio.

Фиг. 7 — Гель-электрофорез в денатурирующих условиях наработанных и очищенных полноразмерных антител анти-IL-6sR человека в 12 % PAGE в присутствии бета-меркаптоэтанола.

Дорожки a-f: a - Fermentas unstained marker, b-f – анти-IL-6sR антитела.

Фиг. 8 — Гель-электрофорез в денатурирующих условиях наработанных и очищенных полноразмерных антител анти-IL-6sR человека в 12 % PAGE в присутствии бета-меркаптоэтанола.

Дорожки a-f: a - Fermentas unstained marker, b-f – анти-IL-6sR антитела.

Фиг. 9 — Клеточный тест ингибирования пролиферации клеток DS-1 анти-IL-6R антителами.

Фиг. 10 — Клеточный тест анализа ингибирования STAT3 пути в культуре клеток HEK-Blue™ IL6 антителом BCD089 (анти-IL-6sR) в сравнении с Тоцилизумабом.

Фиг. 11 — Иммуноферментный анализ взаимодействия антитела BCD089 с IL-6R человека, яванской макаки, крысы и собаки.

Фиг. 12 — Иммуноферментный анализ взаимодействия антитела BCD089 с рецепторами IL-6R человека, кролика и морской свинки.

Фиг. 13 — Кинетики ассоциации и диссоциации BCD089 с альфа-субъединицей IL-6R человека на ForteBio.

Фиг. 14 — Кинетики ассоциации и диссоциации BCD089 с альфа-субъединицей IL-6R яванской макаки на ForteBio.

Фиг. 15 — Кинетики ассоциации и диссоциации BCD089 антитела BCD 089 с IL-6R человека и мыши (IL-6R мыши 250 нМ -черная кривая, IL-6R человека 50 нМ-синяя кривая)

Фиг. 16 — Кинетики ассоциации и диссоциации BCD089 с альфа-субъединицей IL-6R морской свинки на ForteBio.

Фиг. 17 — Гель-фильтрационные профили молекулы BCD089 до (красный) и после инкубации 12 ч инкубации при 50°C (синий).

Фиг. 18 — Оценка противовоспалительной активности препарата BCD-089 на модели коллаген-индуцированного артрита приматов

ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Общее описание способа получения и испытания антител по изобретению

На первом этапе отбирали полипептиды, специфически
5 связывающиеся с растворимой формой рецептора интерлейкина-6
человека (sIL-6R), то есть с его альфа-субъединицей. Для этого
использовали фаговые библиотеки, сконструированные на основе
аминокислотных последовательностей тяжелых и легких цепей
иммуноглобулинов человека. Для построения фаговой библиотеки
10 выделяли и очищали молекулы РНК из клеток крови более 1000 доноров,
из которых (молекул) методом обратной транскрипции и ПЦР в несколько
шагов синтезировали гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов
доноров. Различные комбинации генов связывающихся участков тяжелых
и легких цепей встраивали в бактериофаговые векторы в правильной
15 ориентации и использовали для создания гибридных фаговых библиотек
(фиг. 4).

Селекцию полученных фаговых библиотек проводили на
человеческом белке sIL-6R, который нарабатывали в транзientной
системе клеток CHO-T и очищали из культуральной жидкости на сорбенте
20 IMAC BIORAD.

Клетки, продуцирующие sIL-6R получали реклонированием гена
альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-6 человека в вектор для
транзientной наработки рЕЕ с последующей трансфекцией CHO-T.

Клетки-продуценты выращивали в инкубаторе в течение 7-10 суток.

25 Белок очищали в одну стадию и удостоверились в том, что он
является целевым с помощью метода Westernblot используя
специфические антитела (Human IL-6sR Detection antibody PartNo. 840244
from Human IL-6sR DuoSet ELISA Development Kit Catalog Number: DY227
R&D System).

30 Селекцию полученных фаговых библиотек проводили в два или
более этапов. Отбирали фаги, специфически связывающиеся с
иммобилизованным на пластике sIL-6R. В результате получили множество

фагов, связывающихся с sIL-6R, из которых выделили бактериофаговые векторы. Из этих векторов гены полипептидов, специфически связывающихся с белком амплифицировали и реклонировали в экспрессионные вектора для синтеза белковых молекул в прокариотических клетках *E.coli*. После трансформации клеток полученными плазмидами и синтеза индивидуальных полипептидов провели скрининг и отобрали молекулы, специфически связывающиеся с IL-6sR и блокирующие связывание лиганда с рецептором. Сравнили константы аффинности полученных белков между собой и гены наиболее успешных встраивали в экспрессионные вектора рЕЕ для экспрессии уже полноразмерных антител. После наработки антител в суспензионной культуре клеток яичников китайских хомячков (Chinese Hamster Ovaries, CHO) и их очистки, оценили их аффинность и убедились в блокировании сигнала интерлейкина 6 в различных функциональных клеточных тестах. В результате проведенных исследований и анализа была отобрана одна молекула антитела, специфически связывающаяся с sIL-6R и блокирующая действие IL-6 в клеточных тестах. Ее нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей реклонировали в вектор psX, с помощью которых получили клеточные линии, стабильно продуцирующие антитело. В дальнейшем с помощью полученной клеточной линии нарабатывали выбранное антитело, для которого подобрали схему очистки и условия хранения. Спланировали и начали проведение доклинических исследований полученного препарата.

25

Пример 1.

Продукция рекомбинантных антигенов и антител в суспензионной культуре клеток млекопитающих.

Антитела и антигены продуцировали в клетках транзientной клеточной линии, полученной из клеток яичника китайского хомячка (линия CHO-K1), согласно протоколам Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере, с использованием

30

бессывороточных сред для суспензионных культур производства компании Life Technologies Corporation, согласно инструкциям производителя. Для транзientной экспрессии клетки трансфецировали с помощью линейного полиэтиленимина (ПЭИ «МАХ», компания «Polysciences»). Соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:3-1:10. Через 7-10 дней после трансфекции культуральную среду центрифугировали при 2000 g в течение 20 минут и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии.

10

Пример 2.

Очистка антигенов и антител из суспензионной культуры клеток млекопитающих.

15 Рекомбинантный белок sIL-6R, содержащий шесть аминокислот His на С-конце белка, выделяли и очищали из культуральной жидкости, используя смолу Profinity IMAC Ni-charged (компании Bio-Rad). До очистки в культуральную жидкость добавляли NiCl_2 до концентрации 1 мМ. Далее добавляли в культуральную жидкость 1/200-1/500 объема сорбента Profinity IMAC Ni-charged и перемешивали на качалке 1 час при комнатной температуре. Переносили сорбент на колонку Thermoscientific Polypropylene columns объемом 5 или 10 мл, промывали 5 колоночными объемами 10 мМ фосфатного буфера pH8 с 5 мМ имидазолом и 0,3 М хлоридом натрия, чтобы вымыть неспецифически связывающие компоненты. Связанный антиген элюировали, используя 0,3 М имидазол, pH 8, 0,3 М NaCl. Далее белок переводили в PBS (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию Snake Skin Dialysis Tubing, фильтровали (0,22 мкм) и переносили в пробирки. Пробирки хранили при -70°C . Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза, а идентифицировали с помощью метода вестернблот, используя специфическое антитело анти-IL-6R и конъюгированные козлиные анти-человеческое антитело антитела (Фиг.1 и 2).

30

Исследуемые антитела анти-IL-6R очищали на колонке HiTrap rProteinA FF объемом 1 мл (GE Healthcare). Осветленную культуральную жидкость пропускали через HiTrap rProtein A FF объемом 1 мл (GE Healthcare), которая была уравновешена фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4). Затем колонку промыли 5 колоночными объемами PBS, чтобы вымыть неспецифически связывающие компоненты. Связавшийся белок элюировали, используя 0,1 М глициновый буфер pH 3. Главный протеиновый пик элюции собрали и довели его pH до нейтрального с помощью 1 М буфера Tris (pH 8). Все стадии проводили при скорости потока 1 мл/мин. Далее белок перевели в PBS (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию Snake Skin Dialysis Tubing, профильтровали (0,22 мкм), перенесли в пробирки и хранили при -70°C. Чистоту полученного раствора белка оценили с помощью SDS-гель-электрофореза (Фиг.7 и 8).

Рекомбинантный лиганд IL6-H6-EPEA (интерлейкин 6 с «пептидным хвостом» из 6 гистидинов и последовательностью EPEA на C-конце) очищали на колонке GE Healthcare C16/20 с 5 мл Capture Select C-tag Affinity Matrix. Все стадии проводили при скорости потока 5 мл/мин. Осветленную культуральную жидкость пропускали через колонку, которая была уравновешена фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4). Затем колонку промыли PBS до выхода сигнала спектрофотометра хроматографической системы на плато, чтобы вымыть неспецифически связывающие компоненты. Связавшийся белок элюировали, используя 20mM Tris 2M MgCl₂ pH7,1. Главный протеиновый пик элюции собрали и перевели в PBS (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию SnakeSkinDialysisTubing. Затем профильтровали через фильтр (0,22 мкм) и перенесли в пробирки и хранили при -70°C. Чистоту полученного раствора белка оценили с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг.3).

Пример 3.

Селекция Fab-библиотек фаговых антител человека.

Специфически связывающиеся с sIL-6R фаговые частицы с Fab-

фрагментами человека выделяли из комбинаторной фаговой Fab-
дисплейной библиотеки MeganLibTM (БИОКАД), содержащей более 10^{11}
независимых клонов и синтезированной на основе генов переменных
доменов иммуноглобулинов человека (Фиг.4), согласно
5 модифицированному протоколу (J BiolChem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-
30). Для создания библиотеки использовали лимфоциты более чем тысячи
доноров. Селекцию проводили на рекомбинантном sIL-6R-H6F человека
при условиях, как описано ранее (NatBiotechnol. 1996 Mar;14(3):309-14; J
Mol Biol.1991 Dec 5;222(3): 581-97). Для осуществления селекции методом
10 пэннинга, sIL-6R-H6 или sIL-6R-Fc человека в 50 mM карбонатном буфере
(pH 9,5) адсорбировали в течение ночи при 4°C на поверхности
сорбирующих пробирок EIA/RIA high binding (Greiner bio-one). Пробирки
промывали несколько раз PBST (PBS pH 7,4 и 0,1% Твина 20 v/v), а затем
блокировали вакантные центры связывания белка на поверхности
15 пробирок раствором обезжиренного молока (0,5% m/v в PBST pH 7,4).
Инкубировали раствор обезжиренного молока в пробирках в течение 1 ч.
Далее отмывали пробирки раствором PBST. Затем развели фаговые
библиотеки MeganLibTM в 2-4 мл раствора PBST с 0,5% обезжиренным
молоком до конечной концентрации 10^{13} фаговых частиц на мл.
20 Добавляли подготовленные библиотеки в пробирки со связанным на
поверхности антигеном и инкубировали в течение 1 ч при перемешивании.
Несвязавшиеся фаги удаляли в ходе серий отмывок пробирок раствором
PBST. Количество отмывок увеличивали от первого раунда к третьему
раунду: 20-30-40 раз, соответственно. Оставшиеся связанными фаговые
25 частицы элюировали с пластиковой пробирки 0,1 М раствором Gly-HCl (pH
2,2) в течении 15 мин при перемешивании. Затем переносили раствор в
чистые пластиковые пробирки и нейтрализовали 1 М Tris-HCl (pH 8) 5:1.
Бактерии штамма E. coli TG1 инфицировали полученными фагами, фаги
амплифицировали и использовали в следующем цикле селекции.

Пример 4.**Амплификация бактериофагов.**

Бактериофаг после селекции культивировали, используя штамм *E.coli* TG1. Амплификацию провели посредством заражения фагами культуры штамма-хозяина и последующим ростом в течение 12-15 часов. Раствор фагов после селекции смешивали с культурой подращенных клеток *E.coli* TG1 ($ОП_{600}=0,3-0,4$) и инкубировали 1,5 часа при 37°C. Затем клетки осаждали на 3000-4000 об/мин в течение 10-15 минут, ресуспендировали в 1 мл среды 2TY и растирали на чашки Петри с антибиотиком для селекции (ампициллин). Нарастивали колонии в течении ночи в термостате на 30°C. Спустя 12-15 часов подсчитывали количество колоний и смывали клетки с чашек 5-10 мл среды 2TY. Для этого 100 мкл клеточной суспензии добавили к 20 мл среды 2TY с антибиотиком (ампициллин) и нарастили до на шейкере до $ОП_{600}=0,35-0,5$ на 37°C. Добавили фаг-хэлпер K07 из расчета 1 мкл на 10 мл культуры (10^{10} частиц на мл) и инкубировали на 37°C 1,5 часа при слабом перемешивании. Затем к клеточной культуре добавили равный объем среды с однократным ампициллином (100 мкг/мл) и двукратным канамицином (60 мкг/мл) и двукратным IPTG (0,2мМ). Переставили колбы на качалку и нарабатывали фаг 3-5 часов при 30°C. Культуру клеток центрифугировали 20-30 минут 10 тыс. об/мин и отобрали супернатант в пробирки. После этого добавили 1/6 объёма раствора, содержащего 20% полиэтиленгликоля и 2,5М хлорида натрия, интенсивно перемешали. Инкубировали раствор во льду не менее 3 часов. Затем раствор центрифугировали 10 минут при 8000 g, образовавшийся осадок, содержащий фаги растворили в 1 мл буфера TBS.

Пример 5.

Реклонирование генов Fab-фрагментов с разнообразными вариабельными участками в экспессионную плазмиду.

Из клеток *E.coli* TG1 после третьего раунда селекции выделили

фаговую ДНК (фагмиду) производного фага M13. С фагмиды с помощью ПЦР и концевых специфических праймеров гены Fab-фрагментов с разнообразными вариabельными участками амплифицировали и реклонировали в экспрессионную плазмиду pLL4. Реклонировали гены по сайтам NheI, NotI. Проверили вставку секвенированием 4 случайных колоний.

Пример 6.

Наращивание Fab-фрагментов в клетках *E.coli* BL21Gold с экспрессией белков в клеточную среду роста.

Fab-фрагменты на основе полученных генов синтезировали в клетках *E.coli* BL21Gold. Экспрессионный вектор pLL4 с реклонированными в него генами Fab-фрагментов, из фагмид после 2 или 3 раунда селекций, трансформировали (электропорировали по стандартному протоколу) в экспрессионный штамм *E.coli* BL21Gold. Высеяли на агаризованную среду 2TY (чашки Петри) с селективными антибиотиками (канамицин 30 мкг/мл, ампициллин 100 мкг/мл и глюкоза 0.2%). Высеивали таким образом, чтобы титр клеток подходил для отбора индивидуальных клонов и нарастили колонии 14-16 часов в термостате при 30°C. Отдельные колонии перекололи в стерильные 96-ти луночные плашки (U-shape) со 100 мкл среды 2TY (канамицин 30 мкг/мл, ампициллин 100 мкг/мл и глюкоза 0,4%) на лунку и наращивали на шейкере 800 rpm, 16-18 часов при комнатной температуре. 96-ти канальным репликатором пересеем клеточные культуры на стерильные 96-ти луночные плашки (V-shape) со 100 мкл среды 2TY (канамицин 30 мкг/мл, ампициллин 100 мкг/мл, глюкоза 0,1%, TX100 0,01% и IPTG 0,5 mM) и наращиваем на шейкере при 800 rpm, в течение ночи при комнатной температуре. Центрифугировали плашки на 3500 об/мин 20 мин и отобрали среду с Fab-фрагментами для ИФА в чистые 96-ти луночные плашки (U-shape), хранили плашки на -70°C.

Пример 7.**Анализ специфического связывания Fab с IL-6sR-H6 человека.**

Для отбора специфически связывающихся с IL-6sR-H6 человека Fab-фрагментов использовали стандартный ИФА (ELISA). В качестве

5 позитивного контроля использовали воспроизведенный [US20110245473 seqid 15 и US20110245473 seqid 16] Fab-фрагмент Актемпра (тоцилизумаб). Для анализа специфического связывания использовали 96-луночные планшеты ELISA (от NuncImmunoMaxisorp). На поверхности лунок связывали антиген IL-6sR-H6, для этого в каждую лунку добавили по 50

10 мкл 0,5 мкг/мл раствора IL-6sR-H6 в связывающем карбонатном буфере. Закрывали крышкой и инкубировали в течении ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартной методике ИФА с использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем GenetixQ-pix2xt (от

15 MolecularDevice) и TecanFreedom EVO 200 (от Tecan). На следующий день лунки планшетов пять раз промыли буфером PBST. Для блокирования неспецифического связывания в планшеты добавили блокирующий буфер (200 мкл на лунку, 0,5% обезжиренного молока в PBST). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре.

20 После отмывок PBST в лунки добавили по 50 мкл смеси 1 к 1 тестируемого клеточного супернатанта, содержащие исследуемые Fab-фрагменты, и блокирующего буфера. Инкубировали планшеты с растворами Fab-фрагментов на шейкере в течение часа при комнатной температуре. Спустя час, лунки планшетов пять раз промыли буфером PBST. Затем

25 добавили в лунки планшета раствор конъюгированного вторичного козьего антитела анти-человеческий Fab-фрагмент с пероксидазой (от Pierce-ThermoScientific) в соотношении 1:5000 в PBST по 50 мкл/лунку. Инкубировали планшеты на ротационном шейкере 50 минут при комнатной температуре, а затем промыли пять раз буфером PBST, как описано выше.

30 Колориметрический сигнал получили добавив в лунки раствор субстрата (ТМБ) в ацетатном буфере pH5.5 и H₂O₂ 0,02% (50 мкл/лунку), инкубировали до насыщения сигнала (в среднем 3-5 мин), а затем реакцию

остановили добавлением раствора 10% серной кислоты по 30 мкл/лунку. Сигнал регистрировали на длине волны 450 нм, используя планшетный ридер Tecan-Sunrise (от Tecan). Количество связавшихся с антигеном Fab-фрагментов пропорционально регистрируемым сигналам. Поэтому отбирали клоны, сигнал которых превышал фоновый более чем в 5 раз. Затем отобранные Fab-фрагменты проверили в конкурентном ИФА для выявления антагонистических Fab-фрагментов, блокирующих взаимодействие IL-6 и его рецептора. Клеточные суспензии E.coli BL21Gold с максимальными сигналами переносим в чистые плашки и храним в 15% глицерине на -70C.

Пример 8.

Конкурентный ИФА блокирование Fab-фрагментами взаимодействия IL6 лиганда и IL-6R рецептора

Метод ИФА (ELISA) был использован для проверки антагонистической способности отобранных ранее Fab-фрагментов специфически связывающихся с IL-6R человека. В качестве позитивного контроля антагониста использовали анти-IL-6RFab-фрагмент. Лиганд IL-6-EPEA иммобилизовали на планшетах ELISA (Maxisorp), добавив на лунку по 50 мкл раствора с концентрацией белка 1 мкг/мл в карбонатном буфере. Инкубировали раствор в планшете в течение ночи при 4 °C. Все последующие этапы проводили по стандартной методике ИФА с небольшими изменениями и использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем GenetixQ-pix2xt (от MolecularDevice) и TecanFreedomEVO 200 (от Tecan). Для блокирования неспецифического связывания добавили по 200 мкл блокирующего буфера на лунку (0,5% обезжиренного молока в PBST). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре.

Параллельно в каждые 50 мкл тестируемого клеточного супернатанта, содержащие исследуемые Fab-фрагменты анти-IL-6R,

смешали с 50 мкл раствора рецептора IL-6sR-H6F с концентрацией 0,4 мкг/мл в 1% обезжиренном молоке на PBST в несвязывающем 96-луночном планшете. Инкубировали 1 час при 37 °C на шейкере при 500 об/мин.

- 5 После отмывок планшетов с иммобилизированным лигандом IL6 от блокирующего буфера, переносили в эти планшеты описанную выше реакционную смесь Fab-фрагментов анти-IL-6R и рецептора IL-6sR. Планшеты снова инкубировали на шейкере 45 мин при комнатной температуре, а затем отмыли планшеты пять раз буфером PBST.
- 10 Добавили по 50 мкл/лунку мышиного антитела анти-FLAG (FLAG пептид – это C-концевой пептид на белке IL-6sR-H6F) в PBST и инкубировали 45 минут при тех же условиях. Отмыли планшеты пять раз буфером PBST и добавили разведенные в PBST конъюгированные пероксидазой козьиные антитела анти-мышинные антитела (от Pierce) в разведении 1:5000.
- 15 Планшеты, как и ранее, инкубировали на шейкере 45 мин при комнатной температуре, а затем отмыли пять раз буфером PBST. Колориметрический сигнал получили с помощью раствора TMB (50 мкл/лунку) до насыщения (в среднем 3-5 мин), реакцию останавливали добавлением раствора 10 % серной кислоты (30 мкл/лунку). Цветовой сигнал измеряли при длине
- 20 волны 450 нм, используя планшетный ридер Tecan-Sunrise (производства Tecan). Степень связывания вторичного конъюгированного антитела была пропорциональна цветовому сигналу.

- Отбирали клоны, показавшие блокирование сигнала на уровне контрольного Fab-фрагмента анти-IL-6R, которые и использовали в
- 25 дальнейших анализах. Гены переменных доменов отобранных после данной стадии клонов были секвенированы, согласно стандартным протоколам на аппарате *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) и проанализированы.

Пример 9.**Сравнительный скрининг Fab-фрагментов анти-IL-6R по кинетической константе диссоциации koff (k_{dis})**

Fab-фрагменты, специфически связывающиеся с рецептором IL-6R, и блокирующие взаимодействие рецептора с его лигандом, сравнили друг с другом по аффинности к рецептору. Сравнительный скрининг по константе диссоциации (k_{dis}) для анти-IL-6R кандидатов проводили с использованием прибора OctetRed 96 и анти-FABCH1 биосенсоров (Pall-ForteBio) (фиг.6). Биосенсоры в течение 30 минут регидратировали в рабочем буфере, содержащем 10 mM PBS pH7.2-7.4, 0.1% Твин-20 и 0,1% БСА. В исследуемые образцы среды роста клеток *E. Coli*, содержащих анти-IL-6R Fab-фрагменты, добавляли 1/10 объема 10х-рабочего буфера и перемешали. Затем анти FABCH1 биосенсоры погружали в растворы, содержащие Fab-фрагменты, на 12 часов при 4 °C. Спустя 12 часов сенсоры с иммобилизованными на поверхности Fab-фрагментами переносили в лунки с рабочим буфером, где прописывалась базовая линия (60 с). Далее сенсоры переносили в лунки с раствором анализита (IL-6sR-H6F, 30 мкг/мл) для ассоциации комплекса антиген/Fab-фрагмент (300 с). Затем сенсоры возвращали в лунки, содержащие рабочий буфер, для последующей стадии диссоциации (300 с.). После каждого эксперимента использованные сенсоры регенерировали путем трехкратного помещения их в буфер для регенерации (Gly-HCl, pH 1,7) после чего они использовались в следующих экспериментах. Анализ полученных кривых проводили с помощью программного обеспечения OctetDataAnalysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1.

Результаты koff-скрининга анти-IL-6R кандидатов представлены в таблице 1. Продемонстрировано специфическое связывание всех Fab-фрагментов с IL-6R человека, кандидаты с минимальными значениями были реклонированы для получения полноразмерных антител.

Таблица 1. Проверка kdis связывания анти-IL-6R Fab-фрагментов с альфа-субъединицей человеческого интерлейкина 6 на ForteBio

№	Название клона	K off ForteBio
	Контрольный фаб-фрагмент	7,91E-04
1	>Il6R_CVKSel2_MMP1A4_14	7,63E-04
2	>Il6R_CVKSel2_MMP1A6_16	7,84E-04
3	>Il6R_CVKSel2_MMP1C12_165	1,27E-04
4	>Il6R_CVLSel2_MMP1G11_52	2,64E-04
5	>Il6R_CVLSel2_MMP1H6_113	6,37E-04
6	>Il6R_CVLSel2_MMP1H9_118	6,28E-04
7	>Il6R_CVLSel2_MMP1H10_119	6,50E-04
8	>Il6R_CVLSel2_MMP2A2_129	6,41E-04
9	>Il6R_CVLSel2_MMP2A4_133	1,05E-03
10	>Il6R_CVLSel2_MMP2A5_134	7,00E-04
11	>Il6R_CVLSel2_MMP2A8_143	6,89E-04
12	>Il6R_CVLSel2_MMP2B2_176	3,14E-04
13	>Il6R_CVLSel2_MMP2B3_177	5,81E-04
14	>Il6R_LVLSel2_MMP2C10_367	4,79E-04

5

Пример 10.

Конструирование полноразмерных антител IgG1 путем реклонирования переменных доменов из Fab-фрагментов.

Конструирование полноразмерных антител IgG1 провели с помощью реклонирования генов переменных доменов из экспрессионных плазмид, используемых ранее для наработки Fab-фрагментов. Для реклонирования использовали набор In-Fusion® HD EcoDry™ CloningKit от фирмы Clontech. Нарботали вставки генов переменных доменов путем амплификации в ПЦР со специфичными праймерами, остатки матрицы в ПЦР удаляли обработкой рестриктазой DpnI. Вектор – pEE-плазмиду, линеаризовали рестрикцией Sall и BsiWI для легкой цепи и Sall/NheI для

тяжелой. Смешивали ген-вставку и линеаризованный вектор в 10 мкл воды и перенесли в отдельные виалкистрипы системы In-Fusion. Перемешать пипетированием. Инкубировали стрипы 15 минут при 37 °C, затем 15 минут при 50 °C, далее перенесли в лёд. Часть объема реакции с полученными 5 конструкциями использовали в трансформации клеток. Из полученных клонов выделили плазмиды и проверили вставку с помощью сиквенса.

Пример 11.

10 Клеточный тест ингибирования пролиферации клеток DS-1 анти-IL-6R антителами.

Рост клеток DS-1 зависит от присутствия внеклеточного внешнего IL6 лиганда и блокирование его связывания с рецептором на поверхности клеток приводит к ингибированию их роста. Культуру клеток DS-1 15 подрастили на питательной среде RPMI-1640, 10 % инактивированной эмбриональной сыворотки, 1 mM пирувата натрия и 7,5 нг/мл IL6. За сутки до эксперимента клетки отмыли 2 раза в PBS от остатков IL6 и посеяли на 96-луночный планшет в расчете по 10000 клеток на лунку в среде роста без добавления IL6. На следующий день приготовили ряд разведений 20 антител от 20 мкг/мл с шагом в 3 в полной среде роста с добавлением 5 нг/мл IL6. Затем добавили к клеткам равный объем подготовленных растворов антител, конечная концентрация IL6 в лунках равнялась 2,5 нг/мл, антитела в первой точке 10 мкг/мл. Клетки инкубировали при температуре 37 °C, 5 % CO₂ в течение 3-х суток. Затем измеряли 25 количество живых пролиферирующих клеток с помощью витального красителя AlamarBlue на приборе FluoroskanAscent FL 2.5 (фиг.9). По результатам исследования отобрали одно антитело анти-IL-6R максимально ингибирующее пролиферацию клеток DS-1, следовательно, оно связывается с мембранным рецептором интерлейкина 6 и блокирует 30 связывание лиганда с рецептором.

Пример 12.**Анализ ингибирования STAT3 в культуре клеток HEK-Blue™ IL6**

Приготовили суспензию клеток HEK-BlueIL6 с концентрацией $1 \cdot 10^6$ клонов/мл в питательной среде ДМЕМ с 10 % инактивированной сыворотки (среда роста клеток). Посеяли в 96-луночный планшет из расчета 100 мкл/лунку ($5 \cdot 10^4$ клонов/лунку).

Приготовили ряд разведений антител в среде роста клеток от 200 мкг/мл с шагом 3 десять точек, последняя точка контрольная без антитела. Приготовили раствор человеческого IL6 в среде роста клеток с концентрацией 4 нг/мл. Далее к клеткам добавили по 50 мкл разведенных антител и инкубировали 45 минут в CO₂ инкубаторе. К клеткам с антителами добавили по 50 мкл раствора IL6 и оставили инкубироваться клетки с антителами и IL6 ночь в CO₂ инкубаторе.

На следующий день приготовили среду для детекции QUANTI-Blue™: растворили 1 пакетик сухой среды в 50 мл очищенной воды, прогрели на водяной бане при 37 °C в течение 10 минут и пропустили раствор через фильтр 0,22 мкм.

Для каждой лунки к 180 мкл среды для детекции добавили по 20 мкл культуральной жидкости и оставили в CO₂ инкубаторе на 2-3 часа. Измерили уровень поглощения на спектофотометре при длине волны 630 нм (фиг.10).

Пример 13.**Определение константы аффинности связывания антитела BCD89 с рецептором интерлейкина 6 человека и его ортологов.**

Взаимодействие отобранного антитела анти-IL6R с рецепторами интерлейкина 6 яванской макаки, морской свинки, собаки определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (фиг. 11, 12). Константы аффинности связывания антитела BCD89 к альфа субъединице IL-6sR

человека, яванской макаки, морской свинки, собаки и крысы получили с помощью прибора OctetRed 96 (от ForteBio). BCD89 был неспецифически иммобилизован на поверхность аминореактивных сенсоров второго поколения (от AR2G) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя для подготовки и иммобилизации AR2G сенсоров. Анализ был произведен при 30°C с использованием PBS, содержащим 0,1 % Твин-20 и 0,1 % БСА в качестве рабочего буфера. Титрование IL-6R человека, яванской макаки, морской свинки, собаки, кролика и мыши производили с использованием рабочего буфера от концентрации 126 нМ до 2 нМ с шагом 2.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы OctetDataAnalysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1. Результаты приведены на табл.2.

Как видно, BCD89 связывается с рекомбинантным препаратом IL-6R человека и IL-6sR макаки высокой аффинностью (фиг.13, фиг.14). Кроме того, кандидат взаимодействует с IL-6R морской свинки с константой, меньшей на 3 порядка, чем с человеческим (фиг.16). С рецептором мыши взаимодействия антитела не зарегистрировали (фиг.15).

Таблица 2. Анализ взаимодействий кандидатов BCD89 с рецепторами IL-6sR человека и разных организмов на приборе Octet RED

	sIL6R человека KD, M	sIL6R яванская макака KD, M	sIL6R морской свинки KD, M	sIL6R мыши KD, M
BCD-BCD-089 IgG1	6,63E-10	2,40E-09	3,06E-07	-

Пример 14.

Определение агрегационной стабильности BCD89 в условиях термостресса.

Исследуемые образцы концентрировали до 5 мг/мл с помощью

ультрафильтрации в центрифужных фильтрах AmiconUltra 10 кДа на 0.5 мл (Millipore). Определение содержания белка проводили методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 280 нм. Каждый полученный образец разделяли на несколько частей по 150 мкл и помещали в отдельные пробирки: по одной пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в термостат для пробирок и термостатировали при 50°C в течение установленного времени.

После окончания прогрева пробирки убрали из термостата, давали остыть до комнатной температуры осветляли, центрифугируя растворы при 13 000g 10 минут, и передавали супернатанты на гель-фильтрацию с УФ-детектором. Анализировали пики на хроматограммах полноразмерного белка до и после прогрева, хроматографию провели на хроматографе Agilent USA1100 seriesM. Использовали колонку Tosoh TSK-Gel G3000SWXL 7.8 mm ID Ч 30 cm и предколонку Tosoh TSK-GelGuardSWXL 6 mmID Ч 4 cm, 7 mcm. Скорость потока составила 0,7 мл/мин, а объем пробы - 10 мкл с концентрацией образца 5 мг/мл. Длина волны детектора - 220 и 280 нм, время элюирования 25 мин.(фиг.17).

Расчет проводили методом внутренней нормализации. Содержание мономера в процентах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot 100}{\sum S},$$

где S1 – площадь пика мономера;

$\sum S$ – сумма площадей всех пиков.

При расчете не учитывали пики, которые присутствуют на хроматограммах подвижной фазы и рецептурного буферного раствора.

Пример 15.

Оценка противовоспалительной активности препарата BCD-089 на модели коллаген-индуцированного артрита приматов.

Исследование проведено на самцах яванских мак (*Macaca fascicularis*) с использованием модели коллаген-индуцированного артрита.

Общее количество животных в эксперименте составило 20 голов, каждая группа животных включала 4 обезьяны. В эксперименте были использованы четыре дозы препарата: 1,0 мг/кг; 4,0 мг/кг; 10,0 мг/кг; 20,0 мг/кг, животные контрольной группы получали препарат плацебо.

- 5 Введение препарата и вещества плацебо начинали после предварительной сенсibilизации коллагеном. При проведении эксперимента у животных всех групп измеряли суставную поверхность для вычисления ППВ, на момент окончания исследования забирали пястно-фаланговые и плюсне-фаланговые суставы для оценки выраженности деструктивных изменений. Животные были поделены на 5 групп. Наименование групп приведено в таблице 3.

Таблица 3. Распределение животных по группам в эксперименте по определению противовоспалительной активности

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	4(♂)	МАТ анти ИЛ-6Р	п/к	1,0 мг/кг
2	4 (♂)			4,0 мг/кг
3	4 (♂)			10,0 мг/кг
4	4 (♂)			20,0 мг/кг
5	4 (♂)	Плацебо		-

- 15 Для индукции артрита животным трижды вводили эмульсию бычьего коллагена II типа (Sigma).

Первое введение коллагена. Общее количество вводимого одному экспериментальному животному коллагена составило 2 мг. Для этого 2 мг коллагена растворяли в 0,7 мл 0,1 М уксусной кислоты. К полученному раствору добавляли 0,7 неполного адьюванта Фрейнда.

- 20 Выдерживали животных 28 суток после первого введения коллагена.

Второе введение коллагена. Общее количество вводимого одному экспериментальному животному коллагена составило 3 мг. Для этого 3 мг

коллагена растворяли в 1,0 мл 0,1 М уксусной кислоты. К полученной эмульсии добавляли 1,0 мл полного адъюванта Фрейнда.

Выдерживали животных 21 сутки после второго введения коллагена.

Третье введение коллагена. Общее количество вводимого одному экспериментальному животному коллагена составило 3 мг. Для этого 3 мг коллагена растворяли в 1,0 мл 0,1 М уксусной кислоты. К полученной эмульсии добавляли 1,0 мл неполного адъюванта Фрейнда.

Измерение размера суставов проводили циркулем-измерителем в следующих временных точках:

- 10 - до первого введения коллагена;
- на момент второго введения коллагена;
- еженедельно с момента второго введения коллагена непосредственно перед введением коллагена в течение 7 недель.

В процессе измерения оценивали величину продольной и поперечной оси суставов, процедуру осуществляли для всех пястно-фаланговых и плюснефаланговых суставов за исключением большого пальца. Расчет площади проводили по формуле:

$$ПС = \text{значение для продольной оси} \times \text{значение для поперечной оси} \times 3,14 \times 0,25.$$

Данные для 16 суставов каждого животного использовали для расчета значения процента площади воспаления (ППВ). Расчет проводили по следующей формуле:

$$ППВ = (\text{значение для ПС на день эксперимента} \times 100) / (\text{среднее значение для ПС до индукции артрита}) \text{ (Фиг.18) } .$$

Пример 16.

Исследование токсичности и фармакокинетики (токсикокинетики) препарата BCD-089 при однократном подкожном введении макакам резус.

Исследование проведено на 12 самцах макак резус. Животные были распределены на 4 группы. Наименование групп приведено в таблице 4.

Таблица 4.Распределение животных по группам в эксперименте по токсикокинетике.

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р	п/к	2,0мг/кг
2	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		10,0мг/кг
3	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		50,0мг/кг
4	3 (♂)	Плацебо		-

В ходе проведения исследования оценивали следующие параметры:

- 5 - результаты клинического осмотра;
- вес животных (до введения, на 8, 15, 22, 29, 36, 43 сутки эксперимента);
- температуру тела (до введения, через 1, 2, 4, 6, 24 часа после введения, на 8, 15, 22, 29, 36, 43 сутки эксперимента);
- 10 - общий анализ мочи (до введения, на 8, 15, 22, 29, 36, 43 сутки эксперимента);
- общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина (до введения, на 8, 15, 22, 29, 36, 43 сутки эксперимента);
- 15 - биохимический анализ сыворотки крови по показателям: лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, аспартатаминотрансфераза, аланин-аминотрансфераза (до введения, на 8, 15, 22, 29, 36, 43 сутки эксперимента);
- исследование концентрации препарата в сыворотке крови приматов (до введения, через 0,5, 1, 3, 6, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 192, 264, 408, 504, 720, 912 и 1032 часов после введения).
- 20

Пример 17.

Оценка токсичности при многократном подкожном введении яванским макакам в течение одного месяца с последующим периодом свободным от введения в течение двух недель.

5 Исследование токсичности при многократном подкожном введении в течение 1 месяца с последующим периодом восстановления в течение двух недель проводили на релевантном виде животных – яванских макаках. В эксперименте использовали три уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в таблице 5.

10 **Таблица 5. Распределение животных по группам в эксперименте по оценке токсичности при многократном введении**

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р	п/к	4,0 мг/кг
	3 (♀)			
2	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		15,0 мг/кг
	3 (♀)			
3	3 (♂) *	МАТ против ИЛ-6Р		40,0 мг/кг
	3 (♀) *			
	3 (♂)			
	3 (♀)			
4	3 (♂)	Плацебо		-
	3 (♀)			

В ходе проведения исследования оценивали следующие параметры:

- результаты клинического осмотра;
- вес животных (до введения далее еженедельно);

- температуру тела (до введения далее еженедельно до окончания эксперимента);

- влияние на сердечно-сосудистую систему, для чего оценивали биоэлектрическую активность сердца с использованием кардиографа «Поли-Спектр», оценку проводили до введения препарата и далее на 3, 5, 7 неделях эксперимента;

- общий анализ мочи (до введения, на 3, 5, 7 неделях эксперимента);

- общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина, количество лимфоцитов, количество моноцитов, количество нейтрофилов, количество эозинофилов, количество базофилов, количество тромбоцитов (до введения, затем один раз в неделю, начиная с первой недели эксперимента);

- оценка влияния на свертывающую систему крови по показателям: активированное частичное тромбопластиновое время, концентрация фибриногена, протромбиновое время проводилась до введения препарата далее на 3, 5, 7 неделях эксперимента;

- биохимический анализ сыворотки крови по показателям: натрий, калий, креатинин, мочевины, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, триглицериды, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза холестерин общий (до введения, на 3, 5, 7 неделях эксперимента);

- на момент окончания периода введения проводили эвтаназию и последующее патоморфологическое исследование животных сателлитной группы максимальной дозы, на момент окончания исследования животных максимальной дозы и контрольной группы;

- в рамках проведения исследования токсичности оценивали также местно-раздражающее действие препаратов для чего выделяли и проводили гистологическое исследование мягких тканей в месте введения препарата.

Пример 18.

Исследование иммуногенности при многократном подкожном введении препарата BCD-089 в течение 4-х недель яванским макакам.

Исследование иммуногенности при многократном подкожном введении в течение 1 месяца с последующим двухнедельным периодом восстановления проводили на релевантном виде животных – яванских макаках. В эксперименте использовали три уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в таблице ниже.

Таблица 6. Распределение животных по группам в эксперименте по определению иммуногенности.

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза		
1	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р	п/к	4,0 мг/кг		
	3 (♀)					
2	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		п/к	15,0 мг/кг	
	3 (♀)					
3	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р			п/к	40,0 мг/кг
	3 (♀)					

Оценку иммуногенности проводили по уровню связывающих антител, для чего отбирали кровь и отделяли сыворотку до введения препарата и далее на 3, 5, 7 неделях эксперимента.

Пример 19.

Исследование фармакокинетики при многократном подкожном введении препарата BCD-089 яванским макакам в течение одного месяца.

Исследование фармакокинетики при многократном подкожном

введении в течение 1 месяца с последующим двухнедельным периодом восстановления проводили на релевантном виде животных – яванских макаках. В эксперименте использовали три уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в таблице 7.

5 **Таблица 7. Распределение животных по группам в эксперименте по оценке фармакокинетики при многократном введении**

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза		
1	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р	п/к	4,0 мг/кг		
	3 (♀)					
2	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		п/к	15,0 мг/кг	
	3 (♀)					
3	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р			п/к	40,0 мг/кг
	3 (♀)					

10 Для оценки динамики уровня препарата в сыворотке крови приматов проводили забор до начала эксперимента и далее на 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23, 29, 36, и 43 сутки эксперимента.

Пример 20.

15 **Исследование иммуотоксического действия препарата BCD-089 при многократном подкожном введении в течение одного месяца с последующим периодом восстановления в течение 2 недель.**

Исследование иммуотоксического действия при многократном подкожном введении в течение 1 месяца с последующим двухнедельным

периодом восстановления проводили на релевантном виде животных – яванских макаках. В эксперименте использовали три уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в таблице 8.

Таблица 8. Распределение животных по группам в эксперименте по оценке иммуотоксичности

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р	п/к	4,0 мг/кг
	3 (♀)			
2	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		15,0 мг/кг
	3 (♀)			
3	3 (♂)	МАТ против ИЛ-6Р		40,0 мг/кг
	3 (♀)			
4	3 (♂)	Плацебо		-
	3 (♀)			

В ходе проведения исследования оценивали следующие параметры:

- субпопуляционный состав лимфоцитов, оценивали до введения препарата затем на 2, 4, 6 неделях эксперимента;

- соотношение классов иммуноглобулинов, оценивали до введения на 2, 4, 6 неделях эксперимента;

- влияние на фагоцитоз оценивали до введения и далее на 2, 4, 6 неделях эксперимента.

Пример 21.**Получение фармацевтической композиции.**

Антитело BCD89 переводили в необходимый буфер и довели концентрацию до 180 мг/мл, фильтровали полученный раствор
5 (стерилизующая фильтрация) и наполняли шприцы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающее способностью связываться с рецептором интерлейкина-6 (IL-6) человека, которые содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO: 3.
2. Антитело или его фрагмент по пункту 1, отличающиеся тем, что связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.
3. Антитело или его фрагмент по любому из пунктов 1, отличающиеся тем, что связывающий домен содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3.
4. Антитело или его фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что связывающий домен идентичен по меньшей мере на 90% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.
5. Антитело или его фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.
6. Антитело или его фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что связывающий домен конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.
7. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающийся тем, что содержит последовательность тяжелой цепи, гомологичную не менее чем на 90% последовательности SEQ ID NO 9.
8. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающийся тем, что содержит последовательность легкой цепи, гомологичную не менее чем на 90% последовательности SEQ ID NO 10.
9. Антитело или его фрагмент по пункту 1, отличающийся тем, что содержит в себе: - последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO:9, и - последовательность

вариабельного домена легкой цепи, по меньшей мере на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO:10.

10. Антитело или его фрагмент по пункту 1, характеризующееся тем, что оно относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.
11. Антитело или его фрагмент по пункту 1, характеризующееся тем, что Fc константная часть IgG1 изотипа содержит мутации E233P, L234A, L235A, E236P, L237V и/или L238A.
12. Антитело или его фрагмент по пункту 1, характеризующееся тем, что Fc константная часть IgG1 изотипа содержит мутации, увеличивающие значение фармакинетических параметров в животном или человеке, такие как $t_{1/2\beta}$ (час) или $C_{\max}$ (мкг/мл).
13. Антитело или его фрагмент по пункту 1, характеризующееся тем, что Fc константная часть IgG1 изотипа содержит мутации M255Y, S257T и/или T259E, увеличивающие значение фармакокинетических параметров в животном или человеке, такие как $t_{1/2\beta}$ (час) или $C_{\max}$ (мкг/мл).
14. Антитело или его фрагмент по пункту 1, характеризующееся тем, что оно имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:
 - a) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и хранении при $T = 4^{\circ} \text{C}$ в течение более чем 6 месяцев содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5 % от исходного содержания в растворе;
 - b) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до 37°C в течение более чем 2 недель содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5 % от исходного содержания в растворе;
 - c) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и повышении температуры до 50°C в течение более чем 24 часов содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5 % от исходного содержания в растворе;
 - d) имеет константу диссоциации K_D с рецептором IL-6 человека не более 10^{-9} (M);

- e) имеет кинетическую константу ассоциации $kon(1/Mc)$ с рецептором IL-6 человека не менее $10^5 (1/Mc)$;
 - f) имеет кинетическую константу диссоциации $dis(1/s)$ с рецептором IL-6 человека не более $10^{-4} (1/c)$;
 - g) демонстрирует антипролиферативную активность на культуре интерлейкин-6 зависимых клеток DS1 с расчетной величиной IC_{50} не более $10^{-8} M$;
 - h) демонстрирует блокирование STAT-3 сигналинга на культуре интерлейкин-6 зависимых клеток с расчетной величиной IC_{50} не более $10^{-8} M$.
15. Биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий фрагмент антитела по пункту 1 или по любому из пунктов, подчиненных пункту 1.
16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп. 1-14.
17. Экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько выделенных молекул нуклеиновой кислоты по пункту 166.
18. Клеточная линия, содержащая в клетках вектор по пункту 17 или выделенная молекула нуклеиновой кислоты по пункту 16.
19. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов по пункту 1 или по любому из пунктов, подчиненных пункту 1, включающий культивирование клеточной линии по пункту 18, в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
20. Фармацевтическая композиция для терапии заболевания или состояния, связанного с действием интерлейкина-6 (IL-6), или для устранения или облегчения симптома, связанного с нежелательным воздействием IL-6, содержащая эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по пункту 1 или по любому из пунктов, подчиненных пункту 1, в сочетании с одним или

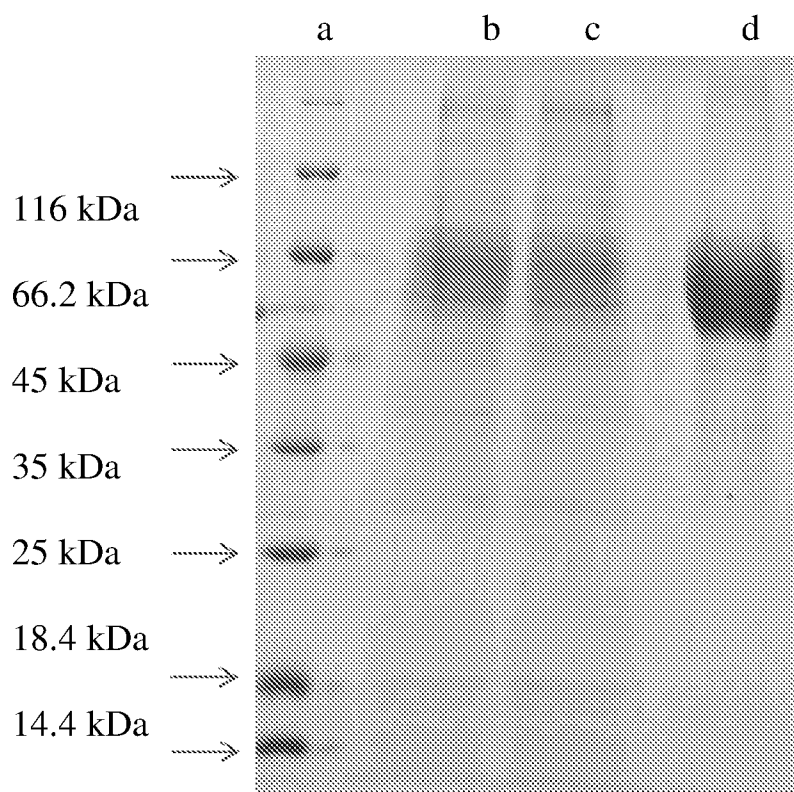
несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

21. Композиция по пункту 20, характеризующаяся тем, что представляет собой раствор для парентерального введения.
22. Композиция по пункту 20, характеризующаяся тем, что представляет собой лиофилизированный порошок.
23. Композиция по пункту 20, характеризующаяся тем, что она предназначена для использования в терапии и/или в диагностике заболевания выбранного из следующего группы заболеваний и/или расстройств: ревматоидный артрит, остеоартрит, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артрит Лайма, псориатический артрит, реактивный артрит, спондилоартропатия, системная красная волчанка, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, инсулинзависимый сахарный диабет, тиреоидит, астма, аллергическое заболевание, псориаз, атопический дерматит, склеродермия, реакция "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, острое или хроническое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органа, саркоидоз, болезнь Кавасаки, болезнь Грейвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпура Шенлейна-Геноха, микроскопический васкулит почек, хронический активный гепатит, увенит, септический шок, синдром токсического шока, септический синдром, кахексия, синдром приобретенного иммунодефицита, острый поперечный миелит, хорея Гентингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный билиарный цирроз, гемолитическая анемия, взрослый (острый) респираторный дистресс-синдром, алопеция, очаговая алопеция, серонегативная артропатия, артропатия, болезни Рейтера, псориатическая артропатия, связанная с язвенным колитом артропатии, атопическая аллергия, аутоиммунное буллезное заболевание, пемфигус обыкновенный, листовидный пемфигус, пемфигоид, болезнь линейных IgA,

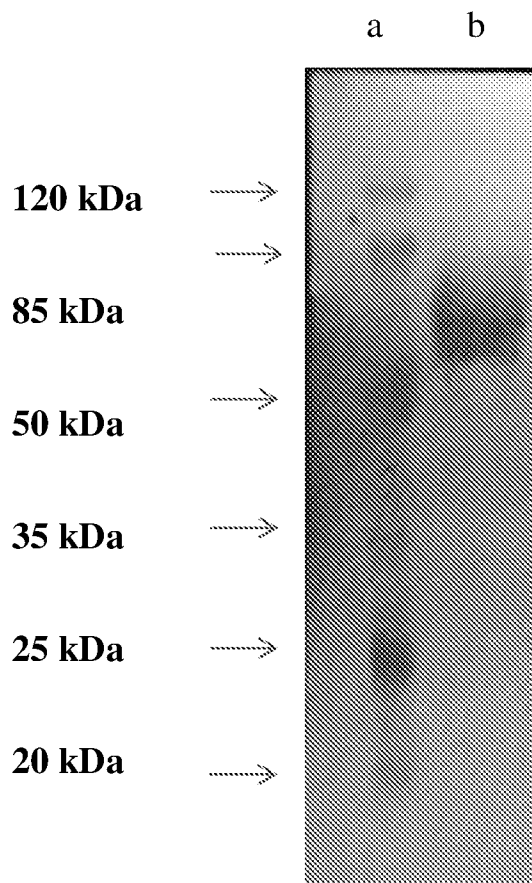
аутоиммунная гемолитическая анемия, Кумбс-положительная гемолитическая анемия, приобретенная пернициозная анемия, ювенильная пернициозная анемия, артериит, первичный склерозирующий гепатит, криптогенный аутоиммунный гепатит, фиброзное заболевание легких, криптогенный фиброзный альвеолит, пост-воспалительное интерстициальное заболевание легких, интерстициальный пневмонит, хроническая эозинофильная пневмония, постинфекционное интерстициальное заболевание легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит I типа (классический аутоиммунный или люпоидный гепатит), аутоиммунный гепатит II типа, остеоартроз, первичный склерозирующий холангит, псориаз I типа, псориаз II типа, идиопатическая лейкопения, аутоиммунная нейтропения, NOS-болезнь почек, гломерулонефрит, микроскопический васкулит почек, дискоидная красная волчанка, идиопатическая или NOS-мужского бесплодия, аутоиммунитет к сперматозоидам, рассеянный склероз (все подтипы), симпатическая офтальмия, легочная гипертензия, вторичная для болезни соединительной ткани, синдром Гудпасчера, легочное проявление узелкового полиартериита, острая ревматическая атака, ревматоидный спондилит, болезнь Стилла, системная склеродермия, синдром Шенгрена, болезнь/артериит Такаясу, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопения, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, гипертиреозидизм, зубный аутоиммунный гипотиреоз (болезнь Хашимото), атрофический аутоиммунный гипотиреоз, первичная микседема, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острое заболевание печени, хроническое заболевание печени, аллергия и астма, психическое расстройство (включая депрессию и шизофрению), опосредуемое типом Th2 и типом Th1 заболеваний, конъюнктивита, аллергический контактный дерматит, аллергический ринит, дефицит альфа-1-антитрипсина, боковой амиотрофический склероз, анемия, кистозный фиброз, нарушения, связанные с

цитокиновой терапией, демиелинизирующие заболевания, дерматит, иридоциклит, увеит, оптический неврит, повреждения при ишемии-реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунное преждевременное угасание функции яичников и блефарит.

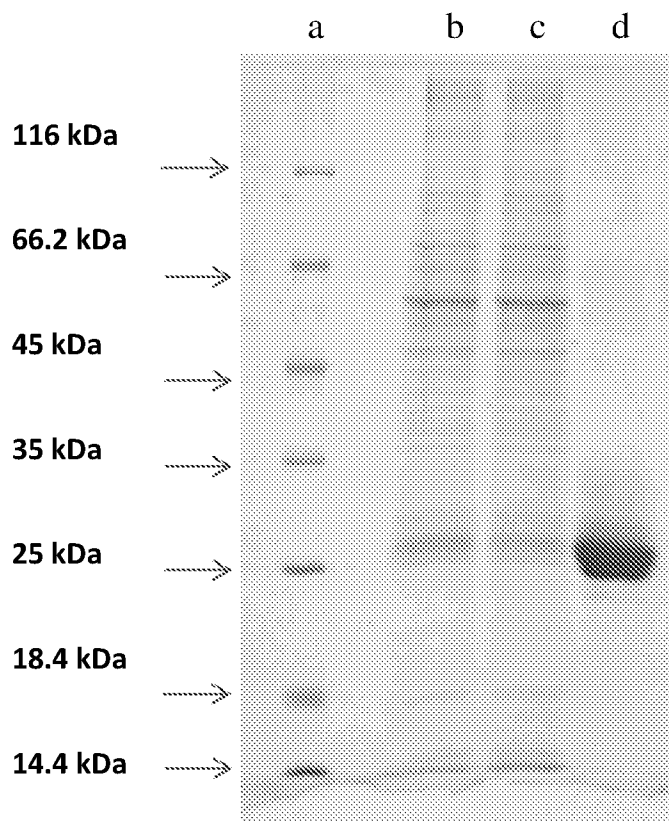
24. Применение антитела или его фрагмента по любому из пунктов 1-14 для изготовления лекарственного средства.
25. Применение по пункту 244, характеризующееся тем, что лекарственное средство предназначено для использования в терапии и/или в диагностике заболеваний, перечисленных в пункте 23.



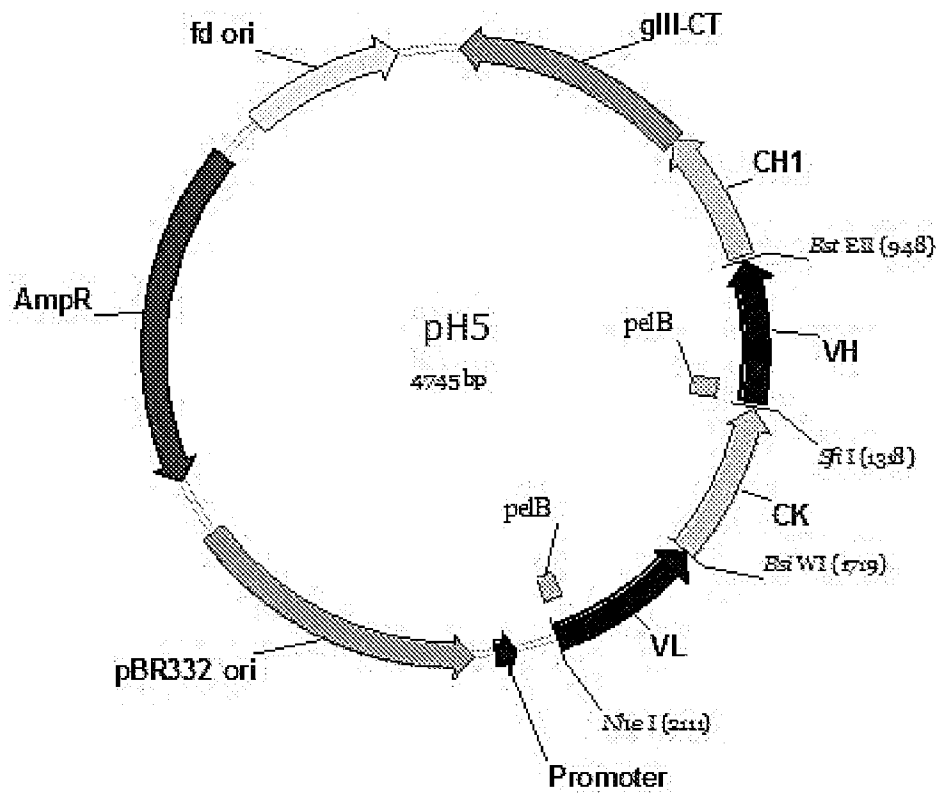
Фиг. 1



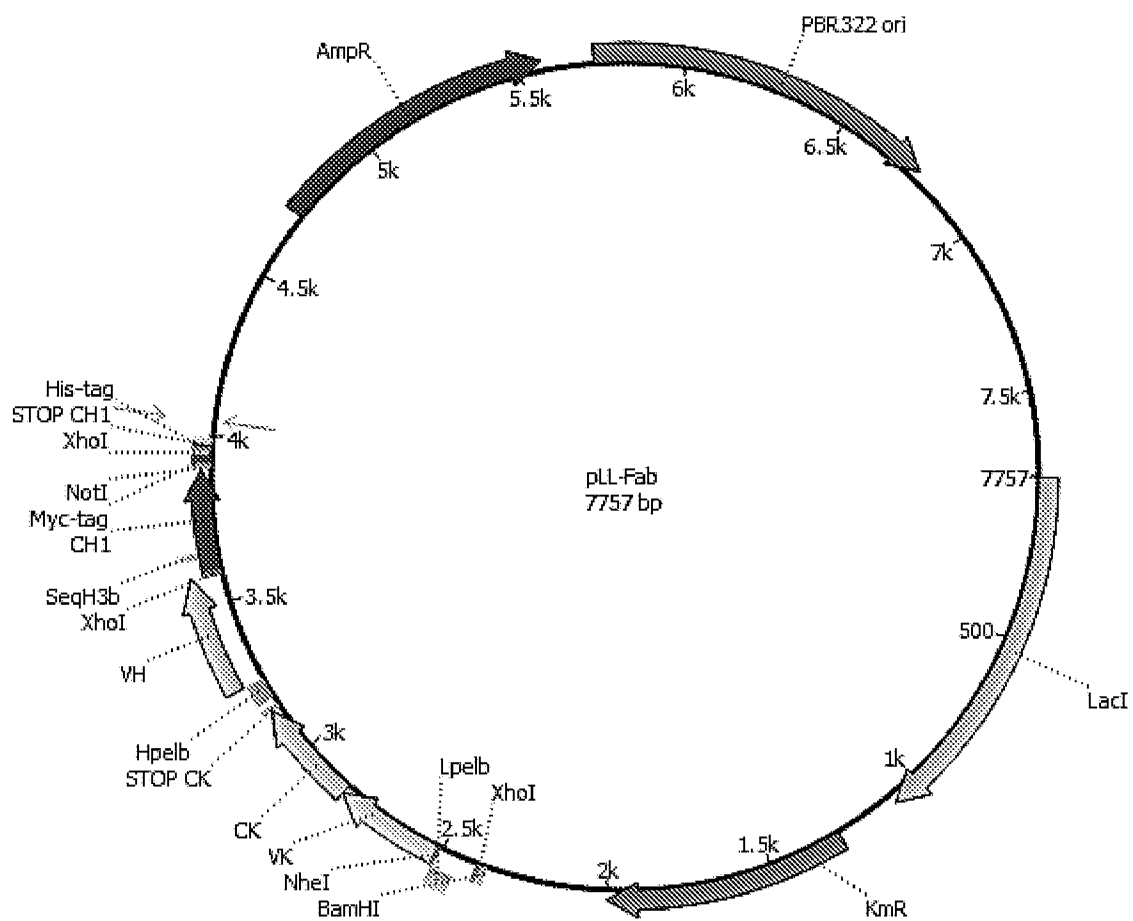
Фиг. 2



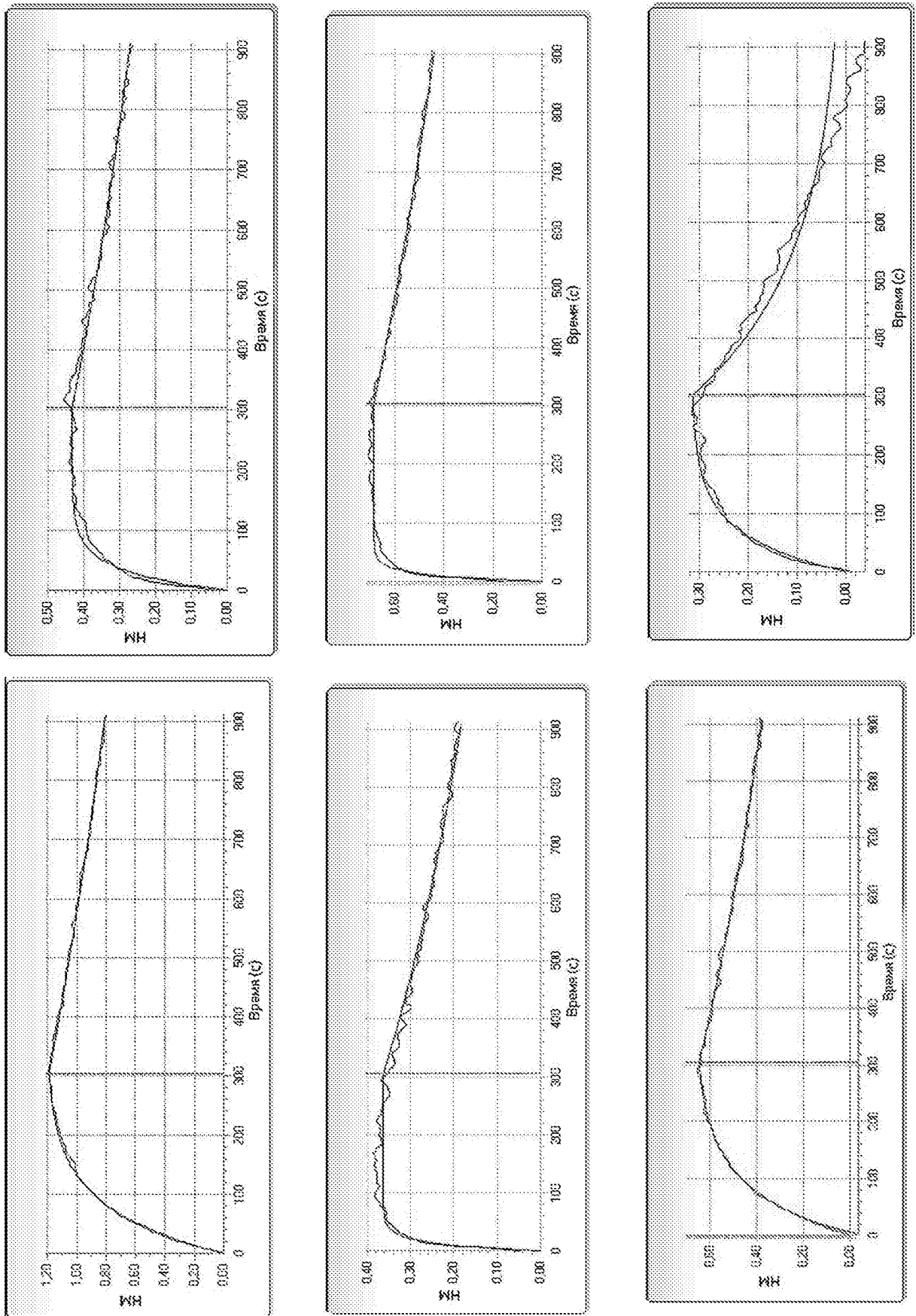
Фиг. 3



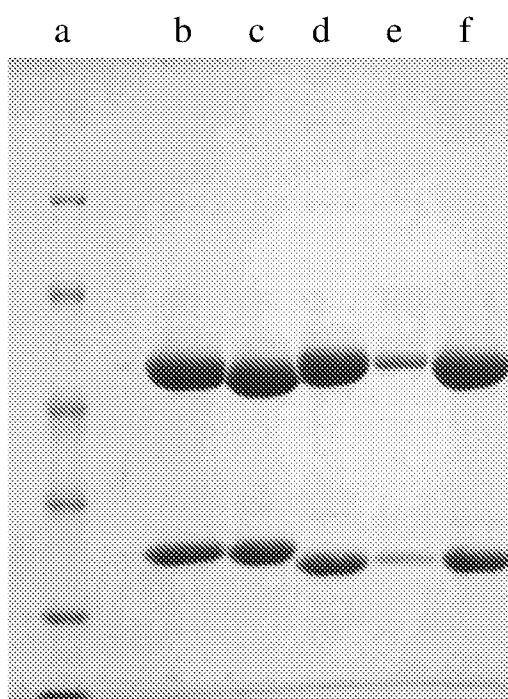
Фиг. 4.



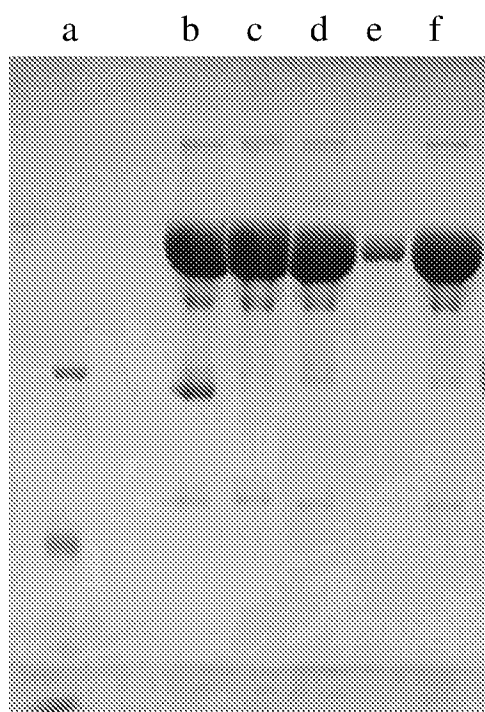
Фиг. 5.



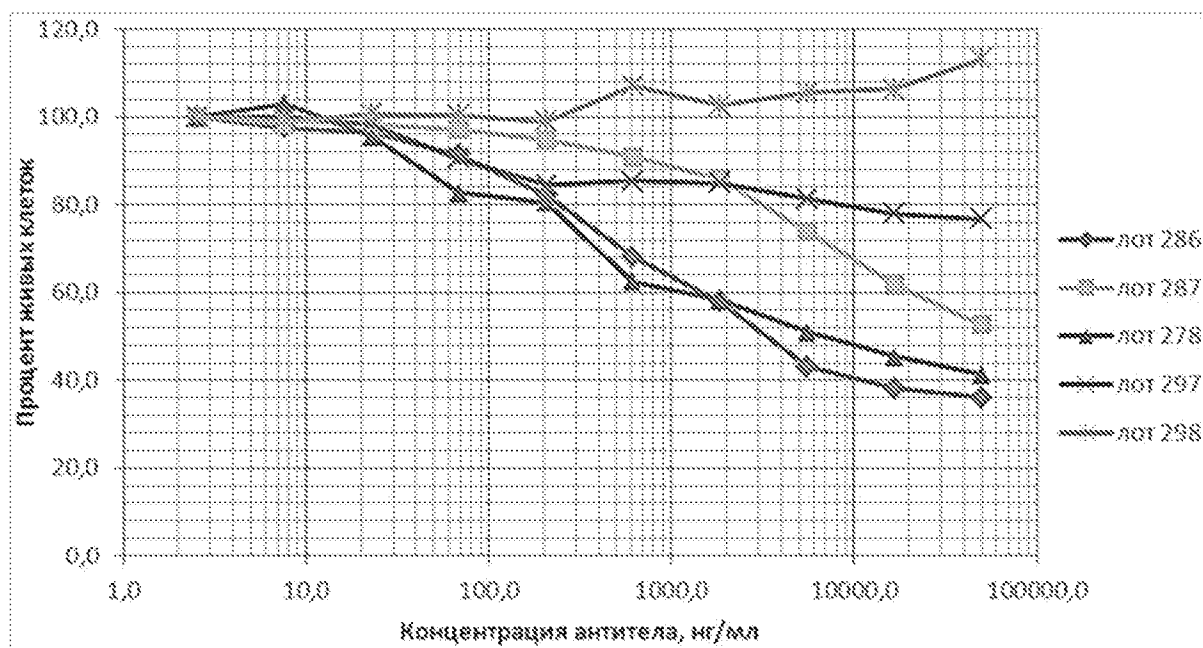
Фиг. 6.



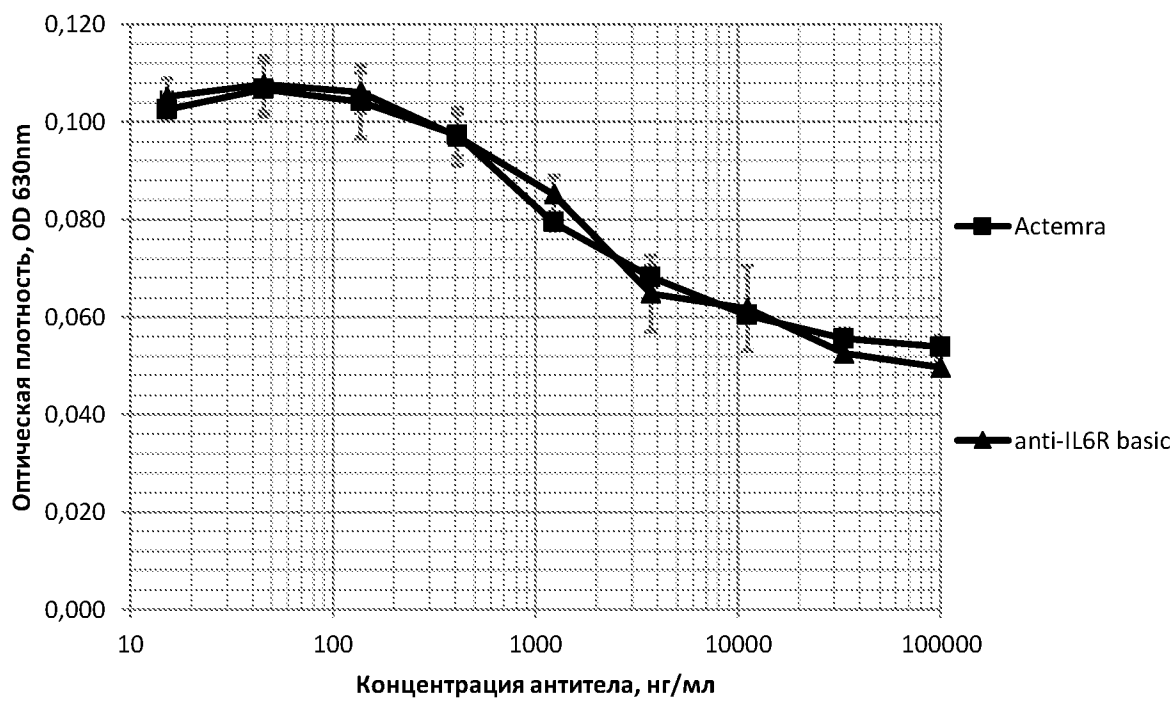
Фиг. 7.



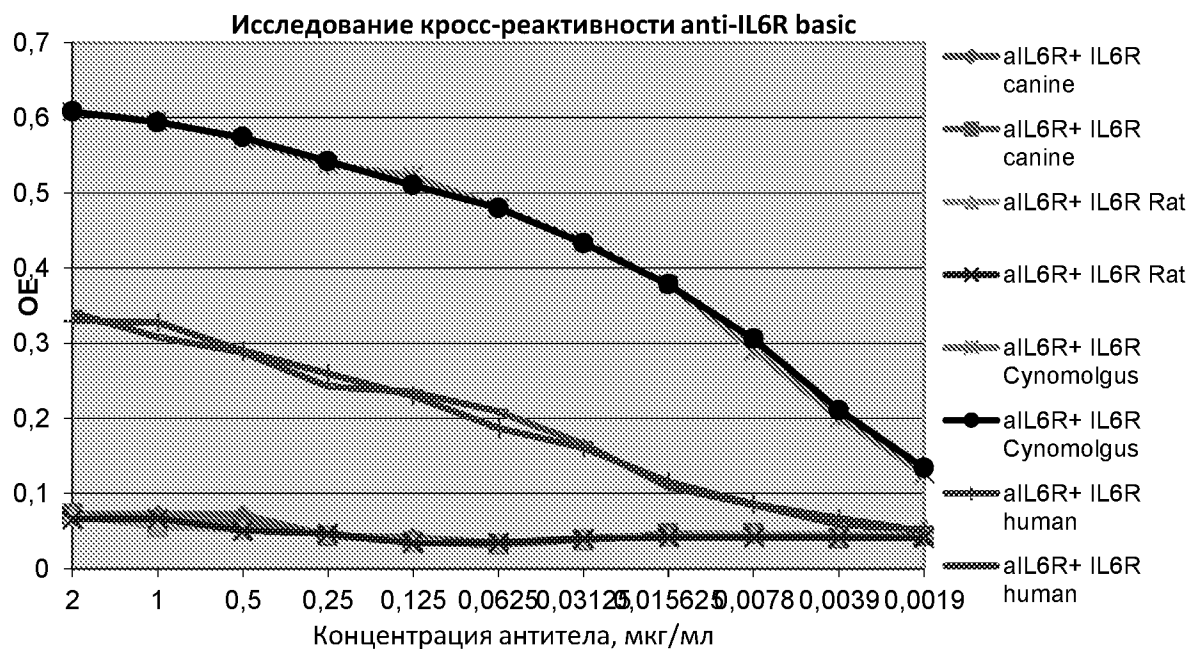
Фиг. 8.



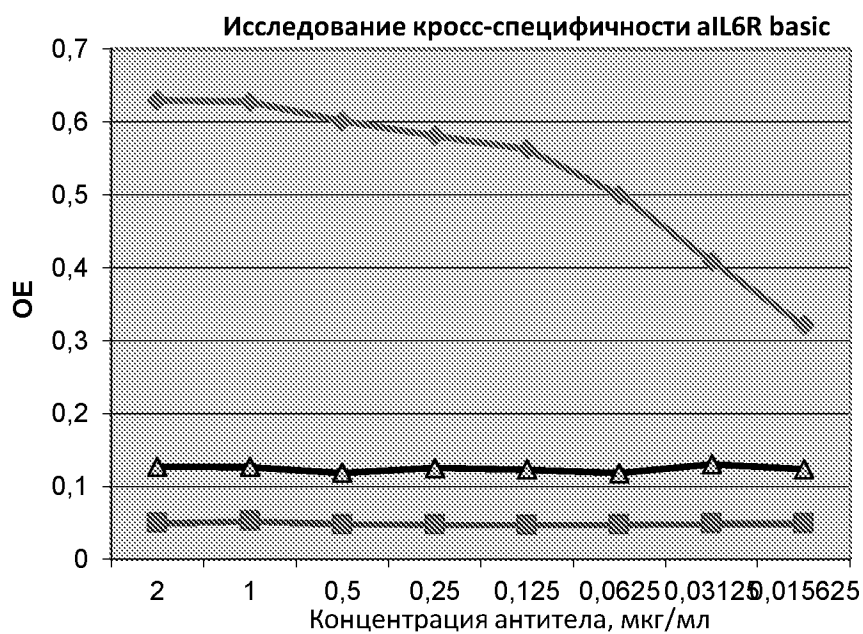
Фиг. 9.



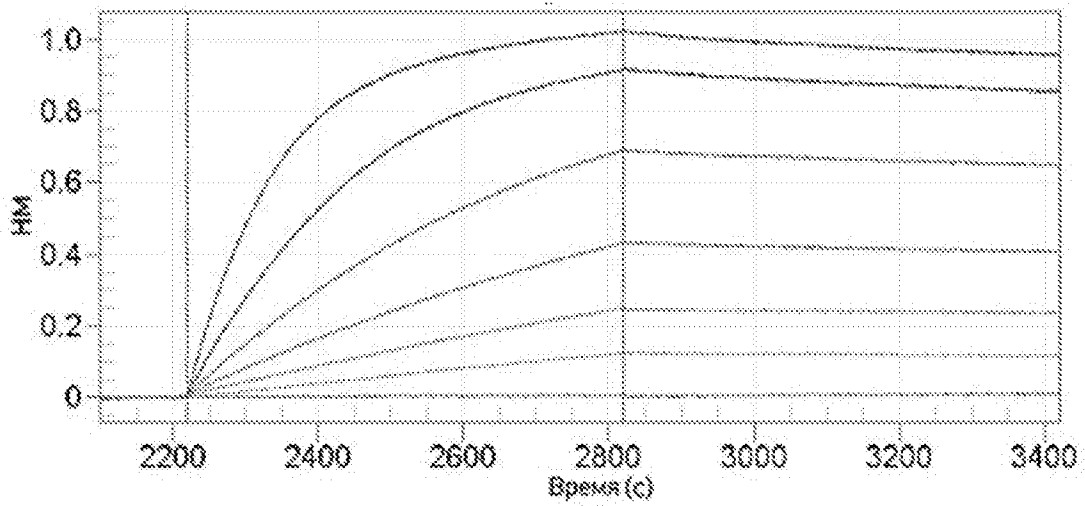
Фиг. 10.



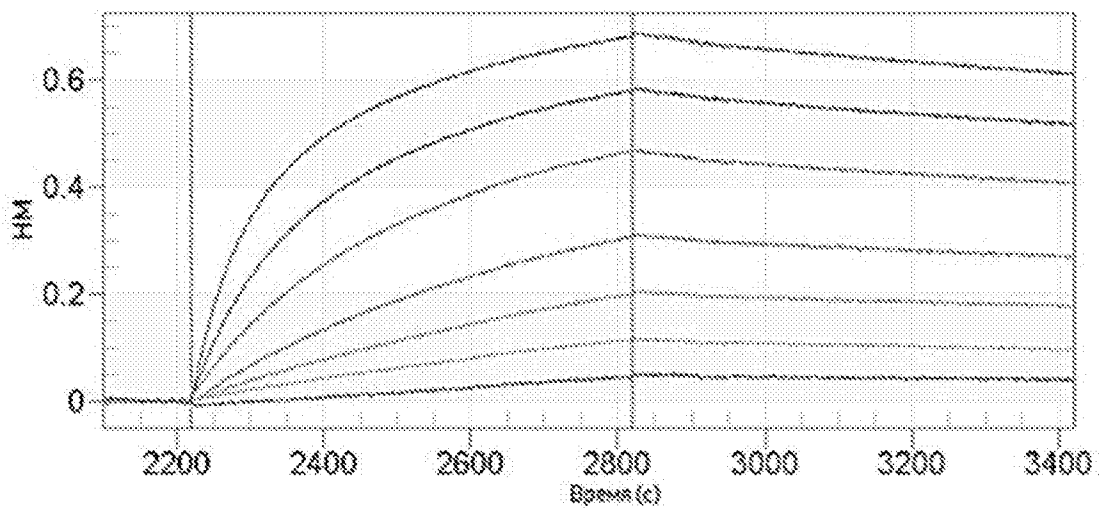
Фиг. 11.



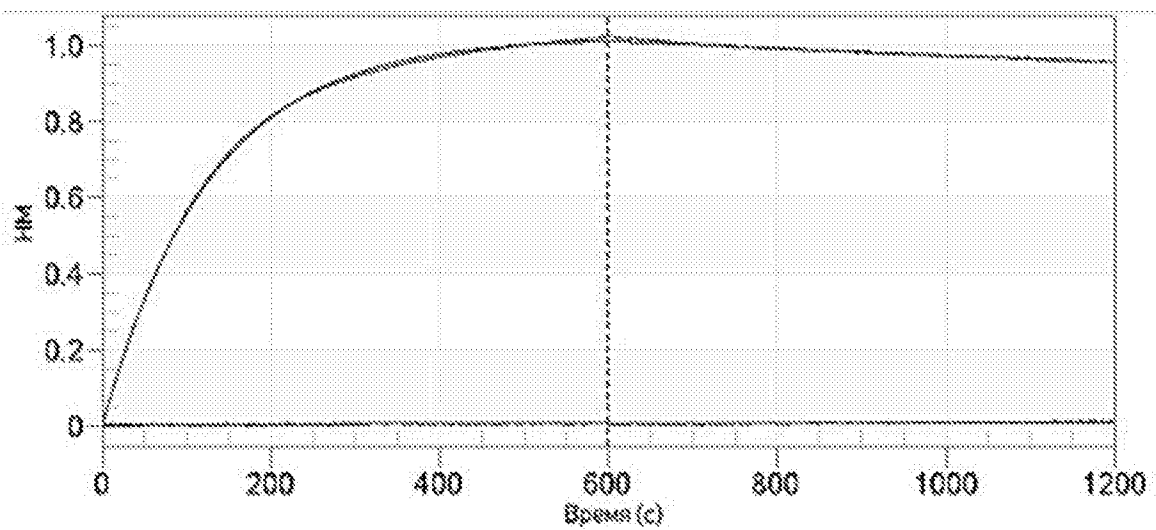
Фиг. 12.



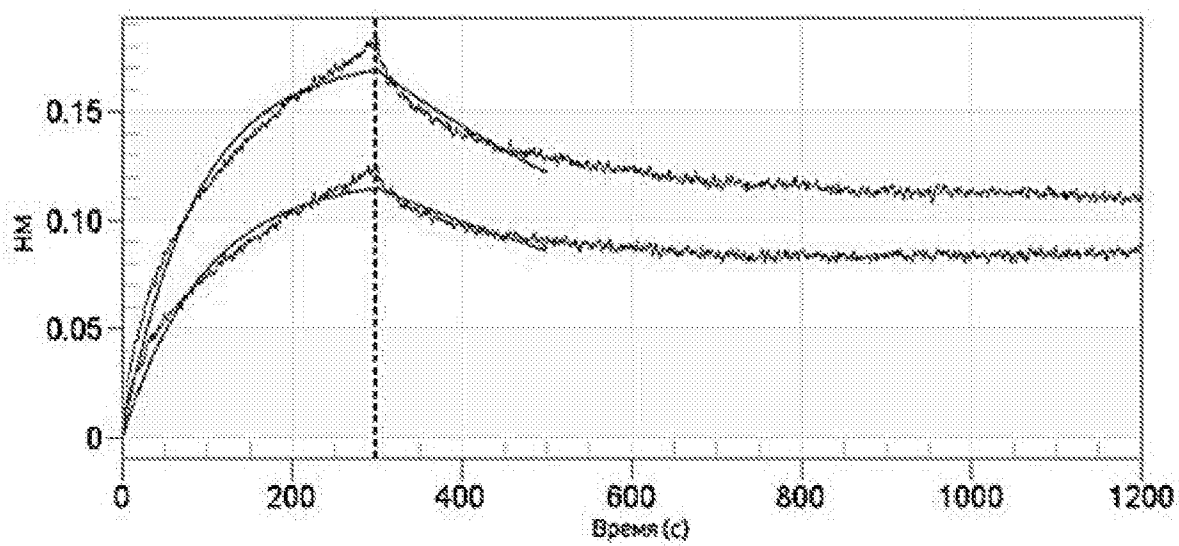
Фиг. 13.



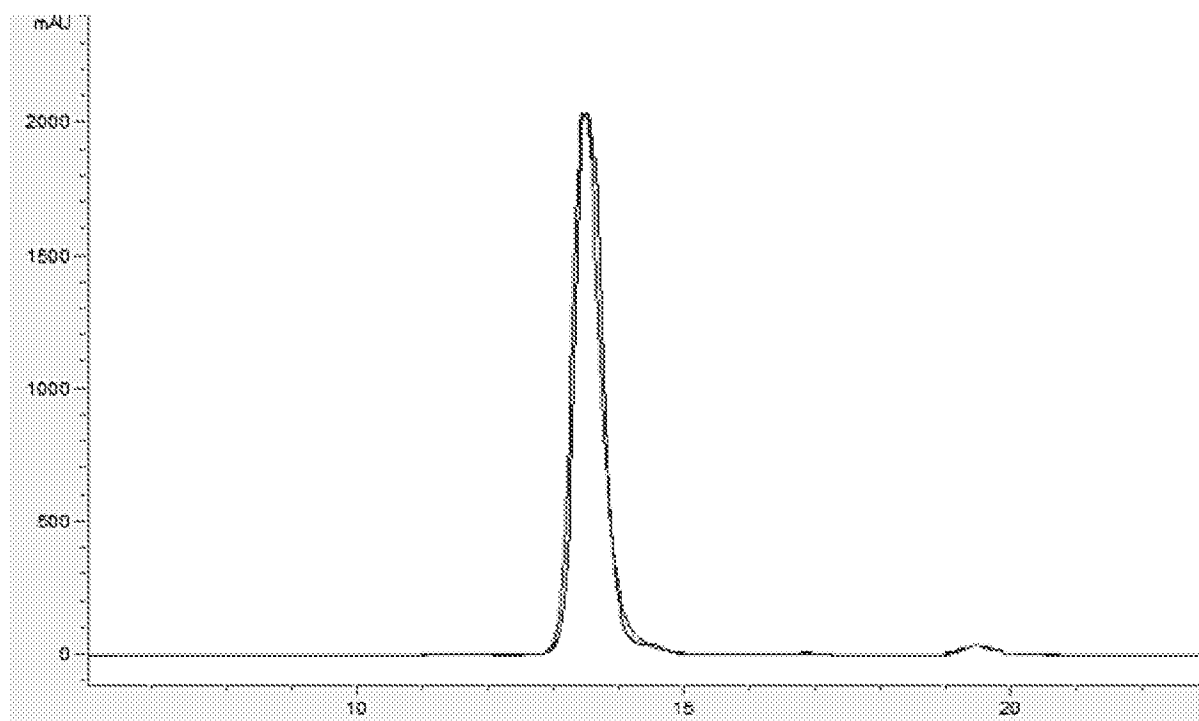
Фиг. 14.



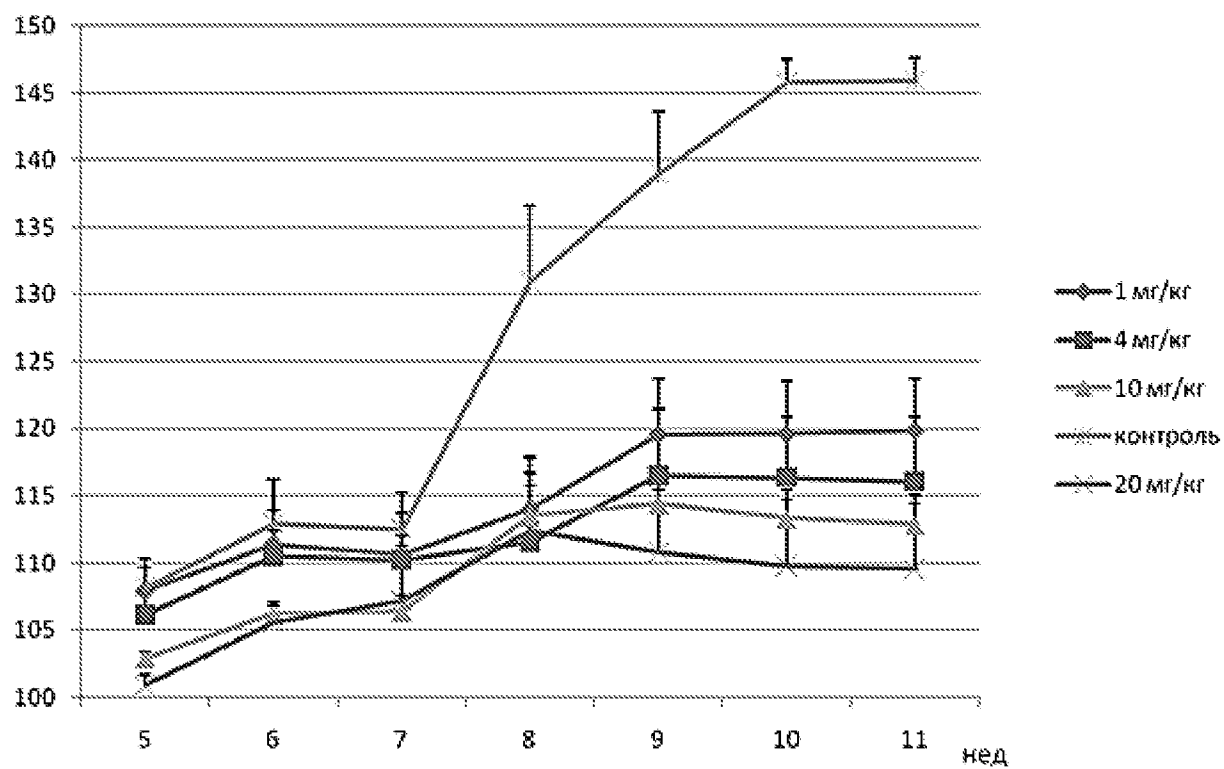
Фиг. 15.



Фиг.16.



Фиг. 17.



Фиг. 18.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2017/050070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18 (2006.01) **C12N 15/63** (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) **C12N 15/00** (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18, 16/24, C12N 15/63, 15/00, A61K 39/395, A61P 37/00.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch, Espacenet, DWPI, USPTO, E-Library, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, Google scholar, PubMed, BLAST, FASTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/280945 A1 (SEAN STEVENS et al) 06.12.2007, paragraphs [0005],[0037]-[0053], the claims	1-25
A	US 8673306 B2 (NOVARTIS AG) 18.03.2014, SEQ ID NO: 115	1-25
A	US 2011/0177074 A1 (SIVAKUMAR PALLAVUR V. et al.) 21.07.2011, paragraphs [0044], SEQ ID NO:537	1-25
A	WO 2015/065987 A1 (IBC PHARMACEUTICALS INC.) 07.05.2015, abstract	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2017 (29.11.2017)

Date of mailing of the international search report

28 December 2017 (28.12.2017)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ		Номер международной заявки PCT/RU 2017/050070	
A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ		<i>C07K 16/18 (2006.01)</i> <i>C07K 16/24 (2006.01)</i> <i>C12N 15/63 (2006.01)</i> <i>C12N 15/00 (2006.01)</i> <i>A61K 39/395 (2006.01)</i> <i>A61P 37/00 (2006.01)</i>	
Согласно Международной патентной классификации МПК			
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА			
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) C07K 16/18, 16/24, C12N 15/63, 15/00, A61K 39/395, A61P 37/00.			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки			
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) PatSearch, Espacenet, DWPI, USPTO, E-Library, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, Google scholar, PubMed, BLAST, FASTA			
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:			
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	
A	US 2007/280945 A1 (SEAN STEVENS et al) 06.12.2007, параграфы [0005], [0037]-[0053], формула	1-25	
A	US 8673306 B2 (NOVARTIS AG) 18.03.2014, SEQ ID NO:115	1-15	
A	US 2011/0177074 A1 (SIVAKUMAR PALLAVUR V. et al.) 21.07.2011, параграф [0044], SEQ ID NO:537	1-25	
A	WO 2015/065987 A1 (IBC PHARMACEUTICALS INC.) 07.05.2015, реферат	1-25	
☐ последующие документы указаны в продолжении графы C. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* “A” “E” “L” “O” “P”	Особые категории ссылочных документов: документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	“T” “X” “Y” “&”	более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста документ, являющийся патентом-аналогом
Дата действительного завершения международного поиска 29 ноября 2017 (29.11.2017)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 28 декабря 2017 (28.12.2017)	
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Уполномоченное лицо: Ю.Бережная Телефон № 495 531 65 15	