

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036368

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.30

(21) Номер заявки
201790341

(22) Дата подачи заявки
2015.08.10

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИ-СК8 АНТИТЕЛА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) 1457704

(32) 2014.08.08

(33) FR

(43) 2017.06.30

(86) PCT/EP2015/068400

(87) WO 2016/020553 2016.02.11

(56) WO-A1-2010136536

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНТЕРНЭШНЛ - ДРАГ -
ДИВЕЛОПМЕНТ - БАЙОТЕК;
ЮНИВЕРСИТЕ КЛОД БЕРНАР
ЛИОН 1; ОСПИС СИВИЛЬ ДЕ
ЛИОН; САНТР НАСЪОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК
(СНРС); ЭНСТИТЮ НАСЪОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ (ИНСЕРМ); САНТР
ЛИОН БЕРАР (FR)

(72) Изобретатель:
Альбаре Мари Александра, Дназ
Жан-Жак, Мертани Ишем Клод,
Сорен Жан-Кристоф, Вермо-Десроше
Клодин, Вюйермоз Борис (FR)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к антителу, фрагменту антитела, гуманизированному антителу и фрагменту антитела, специфически связывающемуся с человеческим цитокином-8 (СК8), а также антигенному пептидному эпитопу для получения указанных антител и их фрагментов, применению таких антител или их фрагментов для лечения опухолей, клетки которых экспрессируют на своей поверхности белок СК8, и фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела или их фрагменты.

B1

036368

036368

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области антител, которые можно применять в терапевтических целях. В частности, настоящее изобретение относится к антителу против цитокератина-8. Эти антитела являются полезными для лечения рака, экспрессирующего цитокератин-8 (СК8), например колоректального рака.

Сведения о предшествующем уровне техники

Цитокератин-8 (СК8) представляет собой белковый компонент промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток.

Различные исследования показали, что белок СК8 связан с цитоплазматической мембраной различных раковых клеток. Например, в работе Godfroid et al. (Journal of Cell Science, 99: 595-607, 1991) описано, что белки СК8 присутствуют на поверхности культивированных клеток рака молочной железы. В работе Hembrough et al. (Journal of Cell Science, 108: 1071-1082, 1995) описано, что белок СК8 или белок, подобный СК8, присутствует на поверхности гепатоцитов, клеток HepG2 и клеток рака молочной железы.

Белок СК8 также был детектирован на поверхности карциномы других типов рака, например рака верхних отделов пищеварительного тракта (Gires et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 328: 1154-1162, 2005). Также было показано, что белок СК8 экспонирован на поверхности инвазивных и неинвазивных опухолевых клеток в колоректальном раке (WO 2010/136536). В частности, было показано, что в колоректальном раке появление инвазивных и/или метастатических клеток сопровождается расщеплением человеческого белка СК8, экспонированного на поверхности этих клеток. N-концевая часть белка СК8 остается экспонированной на поверхности клеток аденокарциномы толстой кишки, а C-концевая часть белка частично или полностью исчезает с поверхности этих клеток.

Колоректальный рак является особенно инвазивным раком. Хотя были достигнуты значительные успехи в лечении пациентов с метастатическим колоректальным раком (CRC), данный тип рака остается значительной глобальной проблемой для общественного здравоохранения (Weitz et al. Lancet 2005; 365: 153-65). Колоректальный рак (CRC) является третьим наиболее диагностируемым раком у пациентов обоих полов с предполагаемыми 940000 случаями в год и второй самой распространенной причиной смертности от рака, составляющей примерно 500000 случаев в год (Weitz et al. Lancet 2005; 365: 153-65). Во Франции каждый год диагностируется 37000 новых пациентов с CRC, из которых около половины умрут от метастатического заболевания. Однако на момент постановки диагноза примерно у 50% из новых 36000 пациентов уже имеются или будут развиваться метастазы (Weitz et al. Lancet 2005; 365: 153-65; Cunningham et al. Lancet 2010; Chevreur Eur J Health Econ 2010).

Разработка более эффективных лекарственных средств (иринотекан, оксалиплатин) позволила значительно улучшить способы лечения пациентов с CRC. В последнее десятилетие также наблюдалась острая потребность в терапиях на основе молекул -моноклональных антител (Mab), направленных против специфических мишеней, сверхэкспрессирующихся (рецепторы EGF или VEGF) в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми клетками. Эти молекулы значительно улучшают способы лечения.

Цитокератин-8 проявляет множество функций, таких как, например, модулирование клеточной инвазии и/или клеточного апоптоза благодаря уникальному отличительному свойству его структуры. При клеточной инвазии СК8 связывается с плазминогеном и тканевым активатором плазминогена (t-PA) и ускоряет активацию плазминогена на поверхностях раковых клеток (J Protein Chem. 1998 Nov; 17(8):845-54). Участок связывания с плазминогеном локализован на C-конце СК8.

Кроме того, оказывая влияние на систему плазминогена, СК8 может быть вовлечен в модулирование сигнальной трансдукции раковых клеток (outside-in signal - передача сигнала в клетки) в ответ на изменения в микроокружении (Deryugina and Quigley, J. Biomed Biotechnol, 2012; 2012:564259).

При клеточном апоптозе цитоскелетная сеть цитокератина 8/18 (СК8/18) является ранней мишенью для расщепления каспазами во время апоптоза. В недавних публикациях было сделано предположение о том, что высококонсервативный и убиквитарный эффекторный домен "смерти", содержащий ДНК-связывающий белок (DEDD), участвует в рекрутинге прокаспазы-9 и -3 в каркасе этого СК8/18. DEDD взаимодействует с сетью промежуточных микрофиламентов СК8/18, а также с прокаспазой-3 и прокаспазой-9 (Apoptosis (2006) 11:1561-1572). Предполагается, что фибриллы СК8/18 могут обеспечивать каркас для индуцированного близостью ауторасщепления и активации прокаспазы-9 в тесной связи с каспазой-3.

Описаны различные моноклональные антитела, связывающиеся с человеческим белком СК8. В частности, в работе Erlandsson et al. (J. of Molecular Recognition, 16: 157-163, 2003; Johansson et al. Cancer Res 1999, 59, 48-51) описано моноклональное антитело TS1, направленное против человеческого белка СК8, его антиидиотип α TS1 и его применение в иммунотерапии карцином. В работе Doljak et al. (Cancer Letters, 267: 75-84, 2008) описано моноклональное антитело, связывающееся с мотивом VKIALEVEIATY, консервативным среди различных цитокератинов. Это моноклональное антитело связывается, в частности, с белками СК2, СК8, СК10 и СК18 в клетках рака молочной железы MCF-7. Это антитело ингибирует активацию плазминогена на клетках MCF-7 in vitro. Антитело M20 под торговой

маркой Sigma® описано Van Muijen, G. et al. (Lab. Invest., 57: 359, 1987; Waseem et al. Biochemistry 2004, 43, 1283-1295). Было показано, что это антитело, специфически связываясь с белком СК8, ингибирует рост и инвазивную способность опухолевых клеток колоректального рака в тестах, проводимых *in vitro* и *in vivo* (WO 2010/136536). В частности, в международной патентной публикации WO 2010/136536 показано, что это антитело специфически связывается с нерасщепленной частью человеческого белка СК8, присутствующего на поверхности опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки. Очищенное антитело M20 было продуцировано мышшиной асцитической жидкостью. Гуманизированный формат Mab не был описан для этого конкретного антитела.

Несмотря на прогресс, достигнутый в отношении идентификации антигенов на поверхности опухолевых клеток и в отношении понимания механизмов, связанных с развитием рака, и хотя этот прогресс позволил разработать моноклональные антитела, которые могут значительно улучшить способы лечения, эффективность и специфичность указанных моноклональных антител может быть дополнительно улучшена. Разумеется, многие из белков, используемых для разработки таргетных терапий, сверхэкспрессируются в раковых клетках, но также экспрессируются на различных уровнях и в здоровых тканях. Таким образом, лекарственные средства, нацеленные на ключевой эпитоп белка, который более специфически экспрессируется на клеточной поверхности в раковой ткани, представляют многообещающий подход к улучшению специфичности противораковых терапий в отношении рака. Таким образом, сохраняется потребность в разработке терапевтических средств для лечения опухолей, клетки которых экспрессируют внешний белок СК8 (еСК8) на своей поверхности, в частности, для лечения, например, колоректального рака. В частности, сохраняется потребность в разработке моноклональных антител, которые не только нацелены на СК8, но и более специфически нацелены на эпитоп, связанный с раком, который препятствует способностям клеток к онкогенезу путем модулирования хорошо описанных важных процессов прогрессирования опухоли, таких как процессы, вовлеченные в клеточную инвазию и клеточный апоптоз.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу или фрагменту антитела, специфически связывающемуся с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. Антитело содержит

тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-H1 содержит последовательность SEQ ID NO: 37 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 37; и

CDR-H2 содержит последовательность SEQ ID NO: 38 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 38; и

CDR-H3 содержит последовательность SEQ ID NO: 39 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 39; и

легкую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 содержит последовательность SEQ ID NO: 34 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 34; и

CDR-L2 содержит последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность по меньшей мере с 70%-й, предпочтительно 80, 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 35;

CDR-L3 содержит последовательность SEQ ID NO: 36 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 36.

Изобретение также относится к гуманизованному антителу или фрагменту антитела, специфически связывающемуся с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. Гуманизованное антитело содержит

тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-H1', CDR-H2' и CDR-H3', где

CDR-H1' содержит последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 37; и

CDR-H2' содержит последовательность SEQ ID NO: 41 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 38;

CDR-H3' содержит последовательность SEQ ID NO: 39 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 39; и

легкую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-L1', CDR-L2' и CDR-L3', где CDR-L1' содержит последовательность SEQ ID NO: 42 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 34; и

CDR-L2' содержит последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность по меньшей мере с 70%-й, предпочтительно 80, 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 35; и

CDR-L3' содержит последовательность SEQ ID NO: 36 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 36.

Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения опухолей, клетки которой экспрессируют белок CK8, в частности пептид, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 29, на своей поверхности.

Также настоящее изобретение относится к человеческому антигенному пептиду CK8, состоящему из полипептида, имеющего от 8 до 16 аминокислот и содержащего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, в частности человеческому антигенному пептиду CK8, состоящему из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29.

Также настоящее изобретение относится к указанному человеческому антигенному пептиду CK8 для его применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением и подходящий фармацевтический носитель, в частности, для ее применения в лечении или предупреждении рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного состояния, вирусной инфекции или вирусного заболевания, и/или в качестве лекарственного средства для индукции апоптоза опухолевой клетки, в частности, для применения в лечении опухолей, клетки которых экспрессируют на своей поверхности белок CK8, в частности пептид с последовательностью согласно SEQ ID NO: 29.

В заключение, настоящее изобретение относится к набору, включающему контейнер, содержащий молекулу, которая может связываться с эпитопом, при этом указанный эпитоп имеет последовательность по меньшей мере с 60%-й, предпочтительно 65, 70, 75, 80, 85, 90 и 100%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 29. Указанный набор можно применять для обнаружения рака.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A и 1B показана детекция с помощью Вестерн-блоттинга изоформ CK8 с использованием различных анти-CK8 антител, включая mD-A10 Mab.

На фиг. 2A и 2B показан уровень конкуренции в присутствии неконъюгированного пептида 1 (SEQ ID NO: 1) или неконъюгированного пептида 2 (SEQ ID NO: 2) при мечении клеток анти-CK8 антителами, измеренный с использованием проточной цитометрии.

На фиг. 3A, 3B и 3C показан уровень конкуренции в присутствии неконъюгированного пептида 1 (SEQ ID NO: 1) или неконъюгированного пептида 2 (SEQ ID NO: 2) при детекции изоформ белка CK8 с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антитела M20, mD-D6 Mab или mD-A10 Mab.

На фиг. 4 показан эффект анти-CK8 антител (50 мкг/мл), включая mD-A10 Mab, на инвазию клеток Isreco-1, индуцированную 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS).

На фиг. 5 показан эффект анти-CK8 антител на пролиферацию клеток Isreco-1.

На фиг. 6A и 6B показан эффект *in vivo* анти-CK8 антител на активацию каспазы-3 в опухолевых клетках Isreco-1.

На фиг. 7 показан эффект анти-CK8 антител, включая mD-A10 Mab, на рост опухоли (Isreco-1) у мышей.

На фиг. 8 показан дозозависимый эффект концентрации mD-A10 Mab на рост опухоли (Isreco-1) у мышей.

На фиг. 9 показан эффект анти-CK8 антител, включая mD-A10 Mab, на рост опухоли (HCT116) у мышей.

На фиг. 10 показан дозозависимый эффект концентрации mD-A10 Mab на рост опухоли (HCT 116) у мышей.

На фиг. 11 показано расположение пептидов 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2), 3 (SEQ ID NO: 3) и 4 (SEQ ID NO: 4) в последовательности человеческого цитоператина-8 (ref: Uni-ProtKB P05787).

На фиг. 12 показана реактивность антитела M20 или mD-A10 Mab в отношении BSA-конъюгированного пептида 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2), 3 (SEQ ID NO: 3), 4 (SEQ ID NO: 4) или 17 (SEQ ID NO: 17) с помощью ELISA.

На фиг. 13A показана реактивность mD-A10 Mab в отношении покрывающих лунки неконъюгированных пептидов 1, 5-28 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 28) с помощью ELISA.

На фиг. 13B показана реактивность M20 в отношении покрывающих лунки неконъюгированных пептидов 1, 5-28 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 28) с помощью ELISA.

На фиг. 14 показан эффект неконъюгированных пептидов 1 и 5-28 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 28) в отношении распознавания антителом mD-A10 Mab BSA-конъюгированного пептида 1 (SEQ ID NO: 1) с помощью ELISA.

На фиг. 15 показан эффект неконъюгированных пептидов 1, 5-28 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 28) в отношении распознавания антителом mD-A10 Mab BSA-конъюгированного пептида 17 (SEQ ID NO: 17) с помощью ELISA.

На фиг. 16 показаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) антитела mD-A10 Mab с описанием FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®.

На фиг. 17 показаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела mD-A10 Mab с описанием FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®.

На фиг. 18 показаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного моноклонального антитела, полученного из mD-A10 Mab.

На фиг. 19 показаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) гуманизированного моноклонального антитела, полученного из mD-A10 Mab.

На фиг. 20 показаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности константной области тяжелой цепи (CH) гуманизированного моноклонального антитела, полученного из mD-A10 Mab.

На фиг. 21 показаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности константной области легкой цепи (CL) гуманизированного моноклонального антитела, полученного из mD-A10 Mab.

Определения.

Термин "антитела", используемый в описании настоящего изобретения, относится к моноклональным антителам (Mab) или поликлональным антителам. Антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные или конъюгированные антитела. Типичное антитело состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, которые соединены дисульфидными связями. Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и вариабельную область. Каждая вариабельная область содержит три сегмента, называемые "участками, определяющими комплементарность" ("CDR") или "гипервариабельными участками", которые ответственны в первую очередь за связывание с эпитопом антигена. Как правило, они называются CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно от N-конца. Более высококонсервативные части вариабельных областей называются "каркасными участками".

Выражение "моноклональные антитела", используемое в описании настоящего изобретения, относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител. В частности, индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением нескольких возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Другими словами, моноклональное антитело состоит из гомогенных антител, образовавшихся в результате пролиферации клона единичной клетки (например, гибридома, эукариотическая клетка-хозяин, трансфицированная молекулой ДНК, кодирующей гомогенное антитело, прокариотическая клетка-хозяин, трансфицированная молекулой ДНК, кодирующей гомогенное антитело, и т.д.), как правило, характеризующегося тяжелыми цепями одного класса и подкласса и легкими цепями одного типа. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые в типичном случае включают различные антитела, направленные против разных детерминант или эпитопов, каждое моноклональное антитело направлено против одного эпитопа антигена.

Выражение "химерные антитела", используемое в описании настоящего изобретения, относится к антителам, содержащим константные части тяжелых и легких цепей антитела заданных видов, например человеческого антитела, на которое привиты вариабельные части тяжелых и легких цепей антитела гетерологичных видов, например мышинного антитела.

Выражение "гуманизированные антитела", используемое в описании настоящего изобретения, относится к человеческим антителам, в которых гипервариабельные участки (CDR) заменены на гипервариабельные участки (CDR) антитела гетерогенного происхождения, например мышинного происхождения, которые составляют антигенсвязывающий участок. Поскольку определенные аминокислоты, локализованные в соседних с CDR (FR) областях, играют роль в структуре антигенсвязывающего участка, человеческие антитела дополнительно могут быть модифицированы (CDR) таким образом, чтобы включать аминокислоты FR антитела гетерогенного происхождения.

Выражение "конъюгированные антитела", используемое в описании настоящего изобретения, относится к искусственно смешанным молекулам, в которых компоненты связаны с антителом, способным селективно распознавать антиген. Эти компоненты могут представлять собой цитотоксические лекарственные средства, противораковые агенты, токсины, фрагменты и/или радиоактивные элементы.

Антитела могут представлять собой мультивалентные антитела, то есть они могут содержать более двух антигенсвязывающих участков, или представлять собой мультиспецифические антитела, при усло-

вии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

Выражение "фрагмент(ы) антител", используемое в описании настоящего изобретения, относится к функциональным частям антител (в противоположность целым антителам), то есть частям антител, способным связываться с антигеном (антигенсвязывающий фрагмент). Следует понимать, что фрагменты антитела сохраняют способность связываться с мишенью (также обычно называемой антигеном) антитела, о котором идет речь. Примеры фрагментов антител включают следующие фрагменты: Fv (состоящий из переменных областей тяжелых и легких цепей антитела), ScFv (двухвалентный одноцепочечный переменный фрагмент), Fab (состоящий из полномерной легкой цепи и части тяжелой цепи), F(ab')₂ (состоит из двух Fab-фрагментов, связанных шарнирной областью), или любой фрагмент, период полувыведения которого будет увеличиваться путем химической модификации, такой как добавление полиалкиленгликоля, такого как полиэтиленгликоль ("пегилирование") (пегилированные фрагменты, называемые Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG или Fab'-PEG) ("PEG" для полиэтиленгликоля), или путем включения в липосому, при этом указанные фрагменты имеют по меньшей мере один из характерных CDR антитела согласно изобретению. Обычно фрагмент антитела может иметь любой максимальный размер до тех пор, пока он является схожим или обладает иммунологическими свойствами, относящимися к антителу, которое специфически связывается с эпитопом антитела, о котором идет речь. Например, связывающиеся структурные единицы и фрагменты легкой цепи антитела могут иметь по меньшей мере 60 аминокислот, менее чем около 200 аминокислот, менее чем около 175 аминокислот, менее чем около 150 аминокислот или менее чем около 120 аминокислот, если фрагмент антитела относится к субъединице легкой цепи антитела. Кроме того, связывающиеся структурные единицы и фрагменты тяжелой цепи антитела могут иметь менее чем около 425 аминокислот, менее чем около 400 аминокислот, менее чем около 375 аминокислот, менее чем около 350 аминокислот, менее чем около 325 аминокислот или менее чем около 300 аминокислот, если фрагмент антитела относится к субъединице тяжелой цепи антитела.

Термин "апоптоз", используемый в описании настоящего изобретения, относится к упорядоченной или контролируемой форме клеточной гибели у млекопитающих, которая обычно сопровождается одним или более характерными клеточными изменениями, такими как конденсация цитоплазмы, утрата микроворсинок плазматической мембраны, сегментация ядра, деградация хромосомной ДНК или утрата митохондриальной функции. Активация цистеиновых протеаз, называемых каспазами, играет важную роль в осуществлении апоптоза.

Термин "инвазия", используемый в описании настоящего изобретения, относится к клеточной миграции и определяет способность клеток стать лабильными и перемещаться сквозь внеклеточный матрикс в пределах ткани или инфильтрировать соседние ткани. Раковые клетки, которые стали инвазивными, могут диссеминировать на вторичные участки и формировать метастазы.

Термин "агонист" или "агонистический", используемый в описании настоящего изобретения, относится к молекуле, которая способна прямо или опосредованно индуцировать, стимулировать или усиливать биологическую активность или активацию СК8.

Термин "антагонист" или "антагонистический", используемый в описании настоящего изобретения, относится к молекуле, которая способна прямо или опосредованно противодействовать, снижать или ингибировать биологическую активность или активацию СК8.

Термин "рак", используемый в описании настоящего изобретения, относится ко всем злокачественным неопластическим образованиям, независимо от их гистологической природы. Существует две основные категории злокачественных опухолей: карциномы эпителиального происхождения и саркомы, происходящие из соединительной ткани. Злокачественные опухоли состоят из инвазивных или распространяющихся атипичных клеток, обычно характеризующихся способностью к автономному росту, нечеткими контурами, способностью инвазировать соседние ткани и сосуды и тенденцией к распространению посредством формирования метастаз.

Термин "полинуклеотид", используемый в описании настоящего изобретения, относится к одноцепочечной нуклеотидной цепи ДНК или РНК или ее комплементу, или к двухцепочечной нуклеотидной цепи комплементарной ДНК (кДНК), или геномной ДНК.

Термин "эпитоп", используемый в описании настоящего изобретения, относится к молекуле, которая может быть распознана паратопом (переменной частью антитела).

Термин "гомология", используемый в описании настоящего изобретения, относится к сходству между пептидными последовательностями. Пептидные последовательности могут иметь делецию, добавление или замену по меньшей мере одной аминокислоты по сравнению с референсным полипептидом.

Используемый в описании настоящего изобретения "процент идентичности" между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяют посредством сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным способом, при этом сравниваемая нуклеотидная или аминокислотная последовательность может содержать добавления или делеции относительно референсной последовательности для осуществления оптимального выравнивания между обеими последовательностями. Процент идентичности рассчитывают, определяя число идентичных положений, в которых нуклеотидный или аминокислотный остаток будет одинаковым в двух последовательностях, предпочти-

тельно в двух полных последовательностях, и деления этого числа идентичных положений на общее число положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100 для получения процента идентичности между обеими этими последовательностями. Например, можно использовать программу BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250), доступную на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>, с параметрами, используемыми по умолчанию (в частности, что касается параметров "штраф за внесение делеции" ("gap open penalty"): 5, и "штраф за продолжение делеции" ("extension gap penalty"): 2; при этом выбранной матрицей является, например, матрица "BLO-SUM 62", предложенная этой программой); процент идентичности между обеими сравниваемыми последовательностями непосредственно вычисляется этой программой.

Мышиное моноклональное антитело D-A10 называется здесь как "mD-A10 Mab".

Химерное моноклональное антитело D-A10 называется здесь как "chD-A10 Mab".

Гуманизированное моноклональное антитело D-A10 называется здесь как "HzD-A10Mab".

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 относится к следующему пептиду:

AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD-C.

SEQ ID NO: 2 относится к следующему пептиду: AEQRGELAIKDANAKLSELE-C.

SEQ ID NO: 3 относится к следующему пептиду: AALQRAKQD-C.

SEQ ID NO: 4 относится к следующему пептиду: SELEAALQRAKQD-C.

SEQ ID NO: 5 относится к следующему пептиду:

AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 6 относится к следующему пептиду: AALQRAKQD

SEQ ID NO: 7 относится к следующему пептиду: EAALQRAKQD

SEQ ID NO: 8 относится к следующему пептиду: LEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 9 относится к следующему пептиду: ELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 10 относится к следующему пептиду: SELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 11 относится к следующему пептиду: LSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 12 относится к следующему пептиду: KLELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 13 относится к следующему пептиду: AKLSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 14 относится к следующему пептиду: NAKLSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 15 относится к следующему пептиду: ANAKLSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 16 относится к следующему пептиду: DANAKLSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 17 относится к следующему пептиду: C-

AIKDANAKLSELEAALQRAKQD

SEQ ID NO: 18 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAALQRAKQ

SEQ ID NO: 19 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAALQRAK

SEQ ID NO: 20 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAALQRA

SEQ ID NO: 21 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAALQR

SEQ ID NO: 22 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAALQ

SEQ ID NO: 23 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAAL

SEQ ID NO: 24 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEAA

SEQ ID NO: 25 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELEA

SEQ ID NO: 26 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSELE

SEQ ID NO: 27 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSEL

SEQ ID NO: 28 относится к следующему пептиду: AIKDANAKLSE

SEQ ID NO: 29 относится к следующему пептиду: LSELEAAL

SEQ ID NO: 30 относится к следующей нуклеотидной последовательности:

AACATTGTTATGACCCAGGCCGACCCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC

AGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTTCTGTATAGTAATGGCAACACTTA

TTTGATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCGCCTGATATATTATAT

GTCCAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGAGGGTCAGGAACCTG

ATTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTA

TGCAAAAGTCTAGAATATCCTTTACAG

SEQ ID NO: 31 относится к следующему пептиду:

NIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLYSNGNTYLYWFLQRPQSPQRLIYY

MSNLASGVDRFSGRSGTDFTLRISRVEADVGVYCMQSLYPTFTGGGKLEIK

SEQ ID NO: 32 относится к следующей нуклеотидной последовательности:

GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGGAGGAGGCTTGGTGCACCGGGGGGGTCA

CGGGGACTCTCTTGTGAAGGCTCAGGGTTTACTTTTGTGGCTTCTGGATGAGCTGG
 GTTCGACAGACCTGGGAAGACCCTGGAGTGGATTGGAGACATTAATTCTGATGG
 CAGTGCATAAAATACGACCATCCATAAAGGATCGATTCACTATCTTCAGAGACA
 ATGACAAGAGCACCTGTACCTGCAGATGAGCAATGTGCGATCTGAGGACACAGCC
 ACGTATTTCTGTATCGCCATTACTCCGGTGGGGGTTTGCTTACTGGGGTCAAGGA
 ACCTCGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 33 относится к следующему пептиду:

EVQLLETGGGLVQPGGSRGLSCEGSGFTFSGFWMSWVRQTPGKLEWIGDINS
 GSAIKYAPSIKDRFTIFRDNDKSTLYLQMSNVRSDETATYFCIAHYSGGGFAYWGQGS
 VTVSS

SEQ ID NO: 34 относится к следующему пептиду: KSLLYSNGNTY

SEQ ID NO: 35 относится к следующему пептиду: YMS

SEQ ID NO: 36 относится к следующему пептиду: MQSLEYPFT

SEQ ID NO: 37 относится к следующему пептиду: GFTFSGFW

SEQ ID NO: 38 относится к следующему пептиду: INSDGSAI

SEQ ID NO: 39 относится к следующему пептиду: IAHYSGGGFAY

SEQ ID NO: 40 относится к следующему пептиду: GFTFSYW

SEQ ID NO: 41 относится к следующему пептиду: INSDGSST

SEQ ID NO: 42 относится к следующему пептиду: KSLLYSNGYNY

SEQ ID NO: 43 относится к следующему пептиду:

DIVMTQAPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYSNGYNYLYWFLQKPGQSPQLLIYY
 MSNLASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSLEYPFTFGQGKLEIK

SEQ ID NO: 44 относится к следующему пептиду:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWSWVRQAPGKGLVWVSINS
 DGSSTKYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIAHYSGGGFAYWGQ
 GTLVTSS

SEQ ID NO: 45 относится к следующей нуклеотидной последовательности:

GAAGTACAATTGGTAGAATCAGGTGGTGGTTGGTTCAGCCAGGAGGATCAC
 TGAGACTGTCTGCGCTGCAAGCGGCTTTACCTTCTAGCTACTGGATGTCTTGGGT
 CCGCAAGCCCCAGGGAAGGACTGGTGTGGGTGAGCGATATTAAAGTGACGGCT
 CTTCTACTAAGTATGCTGATAGTGCAAGGGCCGATTACCATCTCACGAGACAACG
 CCAAGAACACCTTGTACCTCCAGATGAACCTTTTGTAGAGCTGAGGATACAGCAGTGT
 ATTACTGTATCGCCCACTACTCAGGGGGAGGCTTTGCTTACTGGGGTCAAGGCACAC
 TCGTGACAGTCTCCTCT

SEQ ID NO: 46 относится к следующей нуклеотидной последовательности:

GATATTGTAATGACTCAAGCTCCACTCCTTGCTGTAACCTCGGAGAGCC
 CGCTTCTATTAGCTGTAGGAGTAGTAAAGCCTGCTTTACAGTAATGGTTACAATTA
 CCTGTACTGGTTTTTGCAGAAGCCTGGACAGTCACCCAGCTCCTCATCTATTATATG
 TCTAACTTGCCAGTGGTGTCCAGACCGTTTTAGTGGCAGCGGCTCAGGCACCGAC
 TTTACCTTAAGATCAGCCGAGTCGAGGCTGAAGACGTAGGAGTGTACTACTGTATG
 CAGAGTCTTGAGTATCCATTACCTTCGGGCAGGGCACCAAGCTCGAAATAAAG

SEQ ID NO: 47 относится к следующему пептиду:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY
 TLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48 относится к следующей нуклеотидной последовательности:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
 C TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCT
 GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTCC
 AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGACAAAACTCACACATGCC
 ACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
 AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
 TGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACACGAGTGGTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGA
 GCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACATAAGACCAC
 GCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGA
 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
 TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 49 относится к следующему пептиду:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQPE
 SVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 50 относится к следующей нуклеотидной последовательности:

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC
CAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG.

Подробное описание изобретения

Антитела и фрагменты антител.

Авторы изобретения разработали антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность от положения 353 до положения 360 человеческого белка СК8 (ref.: Uni-ProtKB P05787). Аминокислотная последовательность от положения 353 до положения 360 человеческого белка СК8 представлена в SEQ ID NO: 29. Под "специфически" понимается, что антитела или фрагменты антител связываются только с пептидом человеческого СК8, имеющим указанную последовательность. Должно быть понятно, что антитела или фрагменты антител могут связываться с любым фрагментом белка/пептида, содержащим указанную последовательность.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, специфически связывающимся с пептидом согласно последовательности SEQ ID NO: 29. Эти антитела или фрагменты антител определяются в описании настоящего изобретения выражением "антитела или фрагменты антител по настоящему изобретению".

Антитела согласно настоящему изобретению содержат

тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-H1 содержит последовательность SEQ ID NO: 37 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 37; и

CDR-H2 содержит последовательность SEQ ID NO: 38 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 38; и

CDR-H3 содержит последовательность SEQ ID NO: 39 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 39; и

легкую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

CDR-L1 содержит последовательность SEQ ID NO: 34 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 34; и

CDR-L2 содержит последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность по меньшей мере с 70%-й, предпочтительно 80, 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 35; и

CDR-L3 содержит последовательность SEQ ID NO: 36 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 36.

Последовательности CDR определены в соответствии с IMGT®, Kabat® или общепринятой системой нумерации, которая содержит последовательности, общие для IMGT® и Kabat® (смотри раздел "Примеры"). В табл. 1 показаны CDR антител по настоящему изобретению, в частности, антитела mD-A10 Mab.

Таблица 1
Последовательности CDR для VH или VL антитела mD-A10 Mab

	SEQ ID NO:	Последов-ть по IMGT®	SEQ ID NO:	Последов-ть по Kabat®	SEQ ID NO:	Последов-ть (Общепринятая система нумерации)
VL mD-A10						
CDR1	34	KSLLYSNGNTY	34K	RSSKSLLYSNGNTYLY	34C	KSLLYSNGNTY
CDR2	35	YMS	35K	YMSNLAS	35C	YMS
CDR3	36	MQSLEYPFT	36K	MQSLEYPFT	36C	MQSLEYPFT
VH mD-A10						
CDR1	37	GFTFSGFW	37K	GFWM	37C	GFW
CDR2	38	INSDGSAI	38K	DINSDGSAIKYAPSIKD	38C	INSDGSAI
CDR3	39	IAHYSGGGFAY	39K	HYSGGGFAY	39C	HYSGGGFAY

Согласно определению эти CDR содержат вариант CDR, полученный путем делеции, замены или добавления одной или более аминокислот, при этом указанный вариант сохраняет специфичность исходного CDR. Общепринятая система нумерации предлагает определение участка CDR как имеющего короткие аминокислотные последовательности или минимального CDR.

Антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению (анти-СК8 антитела или

фрагменты анти-СК8 антител) эффективно ингибируют инвазивную способность опухолевых клеток *in vitro* и эффективно ингибируют рост опухоли *in vivo*.

Антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению (анти-СК8 антитела или фрагменты анти-СК8 антител) эффективно индуцируют гибель СК8-экспрессирующих раковых клеток *in vivo* посредством опосредованного каспазой-3 апоптоза. В действительности, антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению способны индуцировать *in vivo* расщепление каспазой-3, что является признаком активации апоптоза.

Антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой моноклональные антитела. Указанные моноклональные антитела могут представлять собой мышиные, химерные или гуманизированные антитела. Они могут быть получены стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области.

Моноклональные антитела, в частности, мышиного происхождения, могут быть получены в соответствии с методиками, описанными в руководстве Antibodies (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988), или получены из гибридом. Такие методики хорошо известны специалисту в данной области.

Альтернативно, моноклональные антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены, например, из клеток животного, иммунизированного фрагментом человеческого белка СК8, содержащим пептид, имеющий SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и последующего скрининга моноклональных антител на связывание с пептидом, имеющим SEQ ID NO: 29, путем картирования эпитопов.

Моноклональные антитела согласно изобретению могут быть, например, очищены на колонке для аффинной хроматографии с предварительно иммобилизованным фрагментом человеческого СК8, содержащим пептид с последовательностью SEQ ID NO: 29. Одновременно или последовательно могут быть использованы другие способы очистки, хорошо известные специалисту в данной области.

Химерные антитела могут быть получены с помощью методик генетической рекомбинации. Например, химерное антитело может быть получено посредством клонирования рекомбинантной ДНК, включающей в себя промотор и последовательность, кодирующую вариабельную область нечеловеческого, в частности, мышиного моноклонального антитела, и последовательность, кодирующую константную область человеческого антитела. Химерное антитело согласно изобретению, кодируемое таким рекомбинантным геном, будет представлять собой, например, человекомышиную конструкцию, причем специфичность этого антитела будет определяться вариабельной областью, происходящей из мышиной ДНК, а его изотипы - константной областью, происходящей из человеческой ДНК. Способы получения химерных антител подробно описаны в литературе.

Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием методик, известных специалисту в данной области (таких как, например, описанные в документах Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 and Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Специалисту в данной области также известны и другие методики получения гуманизированных антител, такие как, например, методика "CDR-привития", описанная в патентах EP 0451261, EP 0682040, EP 0939127, EP 0566647 или патентах США 5530101, 6180370, 5585089 и 5693761. Также можно упомянуть патенты США 5639641 или еще 6054297, 5886152 и 5877293.

Для сведения к минимуму ответов анти-V области моноклональные гуманизированные антитела могут быть получены путем прививания на человеческие матрицы только определяющих специфичность остатков (SDR), то есть остатков, которые являются важными для комплементарности поверхностей Mab и его антигена. Исходя из этого, мышиные антитела могут быть гуманизированы путем прививания их определяющих комплементарность участков (CDR) на каркасные участки вариабельных областей легкой (VL) и вариабельных областей тяжелых (VH) цепей молекул иммуноглобулина человека, при этом сохраняя те остатки мышиных каркасных участков, которые могут быть важными для целостности антигеннообъединяющего участка. Однако, поскольку ксеногенные CDR гуманизированных антител могут спровоцировать антиидиотипический (анти-Id) ответ у пациентов, гуманизированные антитела согласно изобретению или их фрагменты могут быть получены с использованием методик, сводящих к минимуму анти-Id ответ. Примеры таких методик включают прививание на человеческие каркасные участки только определяющих специфичность остатков (SDR), то есть остатков CDR, которые являются наиболее важными для взаимодействия антитело-лиганд. SDR идентифицируют с помощью баз данных трехмерных структур комплексов антиген-антитело известных структур или с помощью мутационного анализа антителлообъединяющего участка. Альтернативный подход к гуманизации, который включает удерживание большого количества остатков CDR, основан на прививании "укороченных" CDR, то есть удлинений остатков CDR, которые включают все SDR.

Фрагменты антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены из антител, описанных здесь, путем ферментативного расщепления, например, с помощью пепсина или папаина, и/или посредством расщепления дисульфидных мостиков в результате химического восстановления. Альтернативно, фрагменты антител согласно настоящему изобретению могут быть получены с применением методик генетической рекомбинации или посредством пептидного синтеза. Эти методы хорошо известны специалисту в данной области.

Антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой антитела или фрагменты антител, выбранные из мышиных, химерных и гуманизированных антител, предпочтительно имеющих оптимизированную последовательность.

Выражение "оптимизированная последовательность" означает, в частности, что кодоны, кодирующие конститутивные аминокислоты представляющего интерес белка (например, вариабельные домены антитела), могут быть оптимизированы для лучшего распознавания трансляционным механизмом в заданном типе клеток. В этом отношении аминокислотная последовательность белка, кодируемого оптимизированной последовательностью, является идентичной неоптимизированной последовательности, но нуклеотидная последовательность отличается.

Антитела согласно настоящему изобретению или фрагменты этих антител, могут содержать SEQ ID NO: 31 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 31 и/или SEQ ID NO: 33, или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 33.

Антитела согласно настоящему изобретению или фрагменты этих антител могут содержать вариабельные области, кодируемые полинуклеотидами, имеющими нуклеотидную последовательность мышинной вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 30) или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 30, и/или нуклеотидную последовательность мышинной вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 32) или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 32.

SEQ ID NO: 30 соответствует нуклеотидной последовательности мышинной вариабельной области легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению (mD-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 16).

SEQ ID NO: 31 соответствует аминокислотной последовательности мышинной вариабельной области легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению (mD-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 16).

SEQ ID NO: 32 соответствует нуклеотидной последовательности мышинной вариабельной области тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению (mD-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 17).

SEQ ID NO: 33 соответствует аминокислотной последовательности мышинной вариабельной области тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению (mD-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 17).

В некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению представляет собой mD-A10 Mab.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельных областей легких цепей и тяжелых цепей mD-A10 Mab представлены в табл. 2.

Таблица 2

Кодификации последовательностей для CDR VH и CDR VL

	нуклеотидная последовательность mVL	нуклеотидная последовательность mVH
D-A10	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32
	аминокислотная последовательность mVL	аминокислотная последовательность mVH
D-A10	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 33

Антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению представляют собой предпочтительно гуманизированные антитела или гуманизированные фрагменты антител.

Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению могут содержать тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-H1', CDR-H2' и CDR-H3', где:

CDR-H1' содержит последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 40; и

CDR-H2' содержит последовательность SEQ ID NO: 41 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 41; и

CDR-H3' содержит последовательность SEQ ID NO: 39 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 39; и

легкую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-L1', CDR-L2' и CDR-L3', где

CDR-L1' содержит последовательность SEQ ID NO: 42 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последо-

вательности SEQ ID NO: 42; и

CDR-L'2 содержит последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность по меньшей мере с 70%-й, предпочтительно 80, 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 35; и

CDR-L'3 содержит последовательность SEQ ID NO: 36 или последовательность по меньшей мере с 80%, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 36.

Последовательности CDR гуманизированных антител согласно настоящему изобретению, в частности Hz-DA-10 Mab, приведены здесь в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Последовательности CDR для VH и VL Hz DA-10 Mab

	SEQ ID NO:	Последов-ть по IMGT®	SEQ ID NO:	Последовательность по Kabat®	SEQ ID NO:	Последов-ть (общепринятая система нумерации)
Hz VH D-A10						
CDR1	40	GFTFSSYW	40K	SYWMS	40C	SYW
CDR2	41	INSDGSST	41K	DINSDGSSTKYAPSIKD	41C	INSDGSST
CDR3	39	LAHYSGGGFAY	39K	HYSGGGFAY	39C	HYSGGGFAY
Hz VL D-A10						
CDR1	42	KSLLYSNGYNY	42K	RSSKSLLYSNGYNYLY	42C	KSLLYSNGYNY
CDR2	35	YMS	35K	YMSNLAS	35C	YMS
CDR3	36	MQSLEYPFT	36K	MQSLEYPFT	36C	MQSLEYPFT

Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению или фрагменты этих антител могут содержать SEQ ID NO: 43 или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 43, и/или SEQ ID NO: 44 или последовательность по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 44.

Гуманизированные антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению могут содержать вариабельные области, кодируемые полинуклеотидами, имеющими нуклеотидную последовательность мышиной вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 45) или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 45, и/или нуклеотидную последовательность мышиной вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 46) или последовательность по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 45 соответствует нуклеотидной последовательности гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению (Hz D-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 18).

SEQ ID NO: 46 соответствует нуклеотидной последовательности гуманизированной вариабельной области легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению (Hz D-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 18).

SEQ ID NO: 43 соответствует аминокислотной последовательности гуманизированной вариабельной области легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению (Hz D-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 19).

SEQ ID NO: 44 соответствует аминокислотной последовательности гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению (Hz D-A10 Mab с обозначениями FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 и CDR3 согласно IMGT®, представленными на фиг. 19).

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи Hz D-A10 Mab представлены в табл. 4.

Таблица 4

Кодификация последовательностей для CDR VH или CDR VL Hz D-A10 Mab

	нуклеотидная последовательность VL	нуклеотидная последовательность VH
Hz D-A10	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 45
	аминокислотная последовательность VL	аминокислотная последовательность VH
Hz D-A10	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 43

Фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может представлять собой фрагмент F(ab')₂, Fab, Fv или ScFv.

Антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению эффективно ингибируют инвазивную способность опухолевых клеток *in vitro* и эффективно ингибируют рост опухоли *in vivo*. В частности, авторы изобретения показали, что mD-A10 Mab эффективно ингибирует инвазивную способность клеток Isreco-1 *in vitro* (фиг. 4) и эффективно ингибирует рост опухолевых клеток Isreco 1 и HCT116 у мышей (фиг. 7-10). В частности, авторы изобретения показали, что mD-A10 Mab ингибирует

инвазивную способность клеток Isreco-1 *in vitro*, тогда как антитело mD-D6 не имеет эффекта. Эта антагонистическая активность также наблюдалась у антитела M20 (фиг. 4). *In vivo* только антитело mD-A10 или M20 также контролирует рост опухоли.

Во время апоптоза клетки подвергаются значительным изменениям в морфологии, отчасти вследствие полной реорганизации их цитоплазматических и ядерных цитоскелетных структур. Этот процесс разрушения хорошо скоординирован и включает постепенную активацию каспаз. Некоторые из цитоскелетных компонентов сохраняют функцию во время различных стадий апоптоза и поэтому являются только деассемблированными на более поздних стадиях процесса. Так как во время раннего апоптоза прокаспазы-3 и -9 являются специфически нацеленными на сеть промежуточных микрофиламентов CK8/18, это может объяснять быстрое разрушение цитокератинового каркаса во время апоптоза.

Авторы изобретения показали, что антитело mD-A10 или M20 проявляет эффект против роста опухоли посредством другого молекулярного механизма. Активацию каспазы 3, которая указывает на эффективность апоптоза, анализировали в опухолях, полученных у мышей, не подвергнутых лечению (NT), и у мышей, подвергнутых лечению mD-A10, M20 или mD-D6. Опухоли, анализируемые в этом эксперименте, представляли собой опухоли, которые были получены и подвергнуты анализу в эксперименте, представленном на фиг. 7. В конце периода лечения (53 дня) опухоли собирали, фиксировали в забуференном формалине и заливали в парафин. Срезы тканей подвергали иммуногистохимическим анализам с использованием кроличьих моноклональных антител против расщепленной формы каспазы-3 (фиг. 6B). Для каждой опухоли подсчитывали число клеток, позитивных по активированной каспазе-3, на поверхности площадью 2 мм². Как показано на фиг. 6A, число клеток, позитивных по активированной каспазе-3 значительно более высокое в опухолях от животных, получавших mD-A10 Mab, по сравнению с животными, не подвергнутыми лечению, и животными, получавшими M20 или mD-D6.

Этот результат ясно показывает, что mD-A10 Mab способен индуцировать расщепление каспазы-3, связанное с апоптозом Isreco-1 *in vivo*, тогда как M20 и mD-D6 не проявляют этой способности. Эти результаты демонстрируют, что M20 и mD-A10 Mab проявляют свой эффект против роста опухоли посредством особого механизма. Механизм действия mD-A10 Mab основан на индукции апоптоза посредством расщепления каспазой-3. Схожего эффекта в присутствии M20 не наблюдалось.

Таким образом, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу или фрагменту антитела, проявляющему специфическую агонистическую активность в отношении зависимого от каспазы-3 клеточного апоптоза и специфическую антагонистическую активность в отношении клеточной инвазии. Таким образом, это может быть использовано для лечения заболеваний, в которые вовлечен CK8.

Несмотря на то, что оба mD-A10 Mab и M20 распознают человеческий белок CK8 и обладают антагонистическими свойствами, было показано, что mD-A10 Mab и M20 не распознают один и тот же эпитоп (фиг. 2, 3, 12). В действительности, M20 специфически распознает пептиды, имеющие последовательность, соответствующую аминокислотам в положениях с 338 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 1) или в положениях с 345 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 17), но не детектирует пептиды, имеющие последовательность, соответствующую аминокислотам в положениях с 338 по 357 человеческого белка CK8 (SEQ ID NO: 2), или последовательность, соответствующую аминокислотам в положениях с 358 по 366 человеческого белка CK8 (SEQ ID NO: 3), или последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 354 по 366 человеческого белка CK8 (SEQ ID NO: 4), тогда как mD-A10 распознает пептид, имеющий последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 338 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 1), пептид, имеющий последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 354 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 4), или пептид, имеющий последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 345 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 17), и не детектирует пептиды, имеющие последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 338 по 357 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 2), или последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 358 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 3) (фиг. 12).

Кроме того, детекция с использованием проточной цитометрии (фиг. 2) или вестерн-блоттинга (фиг. 3) изоформ человеческого белка CK8 с помощью антитела M20 не ингибируется ни пептидом, имеющим последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 338 по 366 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 1), ни пептидом, имеющим последовательность, соответствующую аминокислотам в положении с 338 по 357 человеческого CK8 (SEQ ID NO: 2), тогда как детекция изоформ человеческого CK8 с помощью mD-A10 Mab сильно ингибируется пептидом, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO: 1, но не пептидом, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO: 2, и детекция MAb D-D6 ингибируется обоими пептидами, имеющими последовательность согласно SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Расположение пептидов (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2), 3 (SEQ ID NO: 3) и 4 (SEQ ID NO: 4) в последовательности человеческого цитокератина-8 (ref.: Uni-ProtKB P05787) представлено на фиг. 11.

На фиг. 13A описывает реактивность mD-A10 Mab в отношении анти-CK8 пептидов, ограниченных на N- и C-концах (пептид 1, пептид с 5 по 28, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 28). Антитело mD-A10 Mab связывается с пептидами 1, 5, 11-23.

Лейцин в положении 353 пептида 11 является важным для распознавания антителом. Фактически,

связывание mD-A10 Mab с пептидом 10 почти отсутствует по сравнению с пептидом 11. Лейцин в положении 360 пептида 23 является важным для распознавания антителом. Фактически, связывание mD-A10 Mab с пептидом 24 почти отсутствует по сравнению с пептидом 23. Важное присутствие лейцинов в положениях 353 и 360 последовательности эпитопа подтверждается неконкурентностью пептидов 10 (SEQ ID NO: 10) и 24 (SEQ ID NO: 24) в отношении распознавания mD-A10 Mab по данным ELISA (фиг. 14 и 15), когда указанная конкуренция осуществляется с BSA-конъюгированным пептидом 1 или пептидом 17 соответственно. Эпитоп, распознаваемый mD-A10 Mab, разработан, таким образом, в виде последовательности из 8-ми аминокислот "LSELEAAL", соответствующей аминокислотам в положениях с 353 по 360 (SEQ ID NO: 29). Как показано на фиг. 13B наблюдается профиль M20, отличающийся от mD-A10 Mab. Напротив, очевидно, что антитело M20 не распознает эпитоп "LSELEAAL".

В табл. 8 представлен набор аминокислотных последовательностей, а также распознавание, или низкое распознавание, или отсутствие распознавания пептидов с 5 по 28 (с SEQ ID NO: 5 по SEQ ID NO: 28) антителом mD-A10 Mab.

Также настоящее изобретение относится к антителу или фрагменту антитела, специфически связывающемуся с пептидом, имеющим последовательность, соответствующую аминокислотам в положениях с 353 по 360 человеческого белка CK8, то есть специфически связывающемуся с пептидом, имеющим последовательность, показанную в SEQ ID NO: 29, для применения в лечении опухолей, клетки которых экспрессируют на своей поверхности белок CK8, в частности клетки, которые экспрессируют на своей поверхности пептид с последовательностью согласно SEQ ID NO: 29. Антитело или фрагменты антител могут быть такими, как описано выше.

В частности, антитело или фрагменты антител согласно настоящему изобретению можно применять для лечения колоректального рака, рака яичников, рака молочной железы, рака легких, рака яичка, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака лимфатических узлов, рака почек и/или рака головы и шеи. Колоректальный рак, рак яичников, рак молочной железы, рак легких, рак яичка, рак поджелудочной железы, рак нервной системы, рак лимфатических узлов, рак почек и/или рак головы и шеи характеризуются присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих на своей поверхности белок CK8. В частности, антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению можно применять для лечения инвазивного и/или метастатического колоректального рака, рака яичников, рака молочной железы, рака легких, рака яичка, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака лимфатических узлов, рака почек и/или рака головы и шеи.

Предпочтительно антитела или фрагменты антитела, применяющиеся терапевтически, представляют собой гуманизированные антитела.

Пептиды и их применение.

Изобретение также относится к антигенному пептиду человеческого CK8, состоящему из полипептида, имеющего от 8 до 16 аминокислот и содержащего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В частности, изобретение относится к антигенному пептиду человеческого CK8, состоящему из последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

Такой пептид можно применять в качестве терапевтического агента, в частности, в вакцине.

Изобретение также относится к набору, включающему контейнер, содержащий молекулу, специфически связывающуюся с указанным пептидом. Набор, в частности, можно применять для обнаружения рака, в частности рака, характеризующегося присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих на своей поверхности белок CK8, например, таких, которые описаны выше.

Полинуклеотиды.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим пептид, полученный из человеческого CK8, имеющий последовательность, соответствующую аминокислотам в положениях с 353 по 360 человеческого белка CK8 (SEQ ID NO: 29). Предпочтительно полинуклеотиды согласно изобретению относятся к ДНК-типу, в частности типу двухцепочечной ДНК. Термин "полинуклеотид" также относится к модифицированным полинуклеотидам.

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению выделяют или очищают из их природного окружения. Предпочтительно полинуклеотиды согласно настоящему изобретению получают с помощью общепринятых методов молекулярной биологии, описанных Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989), или путем химического синтеза.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим переменные области mD-A10 Mab, имеющим нуклеотидную последовательность мышинной переменной области легкой цепи (SEQ ID NO: 30) и нуклеотидную последовательность мышинной переменной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 32). Таким образом, настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, которые включают одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 или последовательности по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим переменные области H₂ DA-10 Mab, имеющим нуклеотидную последовательность гуманизированной переменной области легкой цепи (SEQ ID NO: 46) и нуклеотидную последовательность гуманизированной переменной области тяжелой

цепи (SEQ ID NO: 45). Таким образом, настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, которые включают одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 или последовательности по меньшей мере с 80%-й, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-й идентичностью после оптимального выравнивания последовательности SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 46.

Фармацевтические композиции.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции или набору, содержащему антитело или фрагменты антитела согласно настоящему изобретению. Антитело или фрагменты антитела могут быть такими, как описано выше. В частности, антитело или фрагмент антитела представляет собой Fv, Fab, F(ab')₂, scFv, антитело, предпочтительно моноклональное антитело.

Фармацевтические композиции могут содержать антитело или фрагмент антитела и подходящий фармацевтический носитель. Примеры подходящего фармацевтического носителя включают растворители, желатин, крахмал, лактозу, стеарат магния, тальк, аравийскую камедь или аналоги. Композиции могут, кроме того, содержать диспергирующие агенты, смачивающие агенты, суспендирующие агенты, солюбилизаторы, стабилизаторы, консерванты, усилители вкуса и/или подсластители.

Набор может включать контейнер, содержащий антитело или фрагменты антитела согласно настоящему изобретению.

Набор, в частности, может быть использован для обнаружения рака, в частности рака, характеризующегося присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих на своей поверхности белок СК8, таких, как описанные выше.

Композиции могут быть составлены для введения млекопитающим, в частности человеку. Они могут быть составлены для перорального, сублингвального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, трансдермального, местного или ректального введения. Таким образом, композиции могут быть обеспечены во всех подходящих формах в зависимости от желательных способов введения. Таким образом, они могут быть представлены в форме перорального или инъектируемого раствора или жидкой суспензии, или в твердой или полутвердой форме, в форме порошков, таблеток, мягких капсул, гранул, таблеток с сахарной оболочкой, твердых капсул, спреев, саше, пилюль, пластинок или паст. Доза варьирует в зависимости от терапии и заболевания, подлежащего лечению.

Композиции или наборы, кроме того, могут содержать еще одно антитело и/или еще одно противо-раковое лекарственное средство.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции согласно изобретению, предназначенной для применения в лечении или предупреждении рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного состояния, вирусной инфекции или вирусного заболевания и/или в качестве лекарственного средства для индукции апоптоза опухолевой клетки.

Также изобретение относится к способу лечения или предупреждения рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного состояния, вирусной инфекции или вирусного заболевания и/или способу индукции апоптоза опухолевой клетки, включающему введение млекопитающему, включая человека, эффективного количества антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению.

Рак, в частности, характеризуется присутствием опухолевых клеток, экспрессирующих на своей поверхности белок СК8, таких, как описанные выше.

Изобретение также относится к композициям вакцин, содержащим пептид согласно настоящему изобретению и подходящий адъювант. В вакцинах адъюванты определяются как вещества, способные потенцировать или модулировать иммунный ответ против одного или нескольких совместно вводимых антигенов. Вакцины обычно вводят путем инъекции, но могут быть введены перорально или путем назального распыления.

Изобретение относится к фармацевтическим или вакцинным композициям для предупреждения и/или лечения опухолей, клетки которых экспрессируют белок СК8 на своей поверхности, в частности, колоректального рака, рака яичников, рака молочной железы, рака легких, рака яичка, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака лимфатических узлов, рака почек и/или рака головы и шеи.

Изобретение также относится к способам терапевтического лечения и/или предупреждения опухолей, клетки которых экспрессируют на своей поверхности белок СК8, в частности, колоректального рака, рака яичников, рака молочной железы, рака легких, рака яичка, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака лимфатических узлов, рака почек и/или рака головы и шеи, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. Изобретение относится к способам лечения рака посредством индукции гибели СК8-экспрессирующих раковых клеток, в частности, путем индукции апоптоза экспрессирующих СК8 раковых клеток путем введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. Антитело или фрагмент антитела может быть таким, как описано выше.

Изобретение относится к применению антител или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предупреждения развития опухолей, клетки которых экспрессируют на своей поверхности белок СК8, в частности, колоректального рака, рака яичников, рака молочной железы, рака легких, рака яичка, рака поджелудоч-

ной железы, рака нервной системы, рака лимфатических узлов, рака почек и/или рака головы и шеи.

Примеры.

Антитело M20, на которое делается обращение ниже, представляет собой коммерчески доступное антитело C5301 (Sigma), и антитело 1E8 представляет собой коммерчески доступное антитело ab28050 (abcam).

Получение анти-СК8 антитела.

Мышиные моноклональные антитела, специфические в отношении СК8, получали с использованием стандартных гибридомных технологий (Zola et al., Aust J. Exp Biol Med Sci. 1981; 59:303-6). Синтезировали два пептида СК8, которые использовали для иммунизации мышей. Последовательности пептидов представляют собой следующие:

Пептид 1: AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD-C (SEQ ID NO: 1)

Пептид 2: AEQRGELAIKDANAKLSELE-C (SEQ ID NO: 2)

Иммунизацию выполняли на трех мышцах OF1 с использованием смеси пептидов 1 и 2, конъюгированных с гемодианином морского блюдечка (KLH). Были отобраны селезенки мышей, сыворотка которых была позитивной в отношении СК8 по результатам детекции методом ELISA. Спленоциты подвергали слиянию с мышинной линией клеток миеломы X63-Ag8.653. Супернатанты гибридом подвергали скринингу на связывание с СК8 с помощью ELISA и иммунофлуоресцентного окрашивания клеток на СК8-позитивные клеточные линии. После клонирования гибридом получали два мышинных антитела (Mabs), названных mD-A10 и mD-D6. Клон D-A10 или D-D6 инъецировали в перитонеальную полость безтимусных мышей. Асцитическую жидкость очищали аффинной хроматографией на колонке с белком А, а затем IgG элюировали при кислом pH, после чего переносили в PBS. После концентрирования раствор PBS, содержащий IgG, фильтровали, и концентрацию Mab определяли при длине волны 280 нм.

Клеточные линии.

Клетки верифицированного рака толстой кишки человека (CC) Isreco-1, Isreco-2, Isreco-3, HCT116+/-, HCT116-/- или HT29 (CLB) выращивали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (Sigma, St Quentin Fallavier, France), дополненной инактивированной нагреванием 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS) (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 4 нМ L-глутамин (Sigma, St Quentin Fallavier, France) и 50 ед./мл, 50 мкг/мл пенициллина-стрептомицина (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Клетки верифицированной аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (ATCC) выращивали в минимальной эссенциальной среде Игла (Sigma, St Quentin Fallavier, France), дополненной инактивированной нагреванием 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS), (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 2 нМ L-глутамин (Sigma, St Quentin Fallavier, France) и 100 ед./мл, 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Лейкозные клетки верифицированного человеческого лейкоза из В-клеток-предшественников Nalm-6 (DSMZ), клетки лимфомы Беркитта человека Raji (ECACC), неходжкинской лимфомы человека RL (DSMZ), гистиоцитарной лимфомы U937 (ECACC), клетки острого лимфобластного лейкоза человека Cem (DSMZ), лейкозные клетки верифицированного острого лимфобластного лейкоза человека Molt4 (DSMZ), человеческие плазматические клетки Fravel (ECACC) выращивали в среде RPMI-1640 (Sigma, St Quentin Fallavier, France), дополненной инактивированной нагреванием 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS), (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 4 нМ L-глутамин (Sigma, St Quentin Fallavier, France) и 100 ед./мл, 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Мечение клеток антителами, анализируемое с помощью проточной цитометрии.

Клеточную экспрессию СК8 на клеточной поверхности анализировали с помощью проточной цитометрии. Вкратце, 2×10^5 клеток на 96-лунок инкубировали с разведением неконъюгированного анти-СК8 мышинного Mab при 10 мкг/мл, затем разбавляли в соотношении 1/10. Несвязанные антитела удаляли, осуществляя промывку с помощью PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), дополненным 1%-м бычьим сывороточным альбумином (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 400 г) и связанное антитело детектировали с помощью флуоресцеинизотиоцианат (FITC)-конъюгированного козьего (Fab')₂ поликлонального антимышиного антитела (MP Biomedical, Illkirch, France) при 4°C в течение 30 мин. Реагент для детекции удаляли путем промывания и клетки центрифугировали (5 мин при 400 г) и суспендировали в 300 мкл PBS. Связанное детектируемое антитело количественно оценивали на FACS CAN (BD Biosciences, Rungis, France), (канал FL1, 2000 событий на запрашивание).

Результаты экспериментов показаны в табл. 5 с концентрацией MAb 5 мкг/мл. Различные раковые клеточные линии, такие как клеточные линии рака толстой кишки или молочной железы, экспрессировали СК8. Экспрессии не наблюдалось в клетках лимфомы или лейкоза.

Таблица 5

Клеточная реактивность МАb на линиях клеток человека

Название линии клеток	Тип линии клеток	1E8		M20		D-D6		D-A10	
		%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM
ISRECO-1	Карцинома толстой кишки человека	45+/-18	562+/-144	50+/-11	553+/-69	50+/-7	421+/-32	47+/-7	421+/-46
ISRECO-2	Карцинома толстой кишки человека	23+/-0	424+/-28	26+/-0	473+/-30	44+/-26	317+/-80	43+/-27	323+/-89
ISRECO-3	Карцинома толстой кишки человека	41+/-6	402+/-105	33+/-6	541+/-13	43+/-3	340+/-40	42+/-4	351+/-21
HCT116+/+	Карцинома толстой кишки человека	35+/-14	554+/-62	29+/-11	527+/-64	44+/-19	356+/-1	36+/-21	396+/-16
HCT116-/-	Карцинома толстой кишки человека	38+/-11	530+/-52	28+/-10	517+/-59	32+/-6	385+/-13	33+/-2	411+/-11
HT29	Аденокарцинома толстой кишки человека	30+/-7	418+/-11	17+/-9	497+/-52	28+/-13	365+/-15	27+/-13	361+/-3
MCF-7	Карцинома молочной железы	52+/-1	462+/-1	66+/-17	476+/-10	51+/-23	388+/-13	50+/-23	397+/-30
Nalm6	Лейкоз человека из В-клеток-предшественников	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
Raj1	Лимфома Беркитта человека	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
RL	Неходжкинская лимфома из В-клеток человека	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
U937	Гистiocитарная лимфома человека	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
Cem	Острый лимфобластный лейкоз человека	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
Molt4	Острый лимфобластный лейкоз человека	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
Fravel	Плазматические клетки человека	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-
PBMNC	Лимфоциты	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-	0+/-0	-

Эксперименты по конкурентному связыванию Mab с помощью проточной цитометрии.

2×10^5 клеток Isreco-1 на 96-лунок инкубировали с биотинилированным анти-CK8 антителом (12,5 мкг/мл) с пептидом 1 или пептидом 2, или без них, тестируемых при различных концентрациях, и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Несвязанные антитела удаляли, осуществляя промывку с помощью PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), дополненного 1%-м бычьим сывороточным альбумином (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 400 г) и связанные антитела детектировали с помощью фикоэритрин-конъюгированного стрептавидина (Interchim, Montlucon, France) при 4°C в течение 30 мин. Реагент для детекции удаляли путем промывки и клетки центрифугировали (5 мин при 400 г) и суспендировали в 300 мкл PBS. Связанное детектируемое антитело количественно оценивали на FACS CAN (BD Biosciences, Rungis, France), (FL2 канал, 2 000 событий на запрашивание). Во время эксперимента включали соответствующие контроли изотипа для исключения любых событий неспецифического связывания. Результаты экспериментов показаны на фиг. 2. Присутствие пептида 1 ингибирует мечение клеток антителом mD-D6 или mD-A10 Mab без какого-либо значительного воздействия на окрашивание клеток M20 Mab.

Детекция изоформ белка CK8 с помощью вестерн-блоттинга.

Различные изоформы, а также их установленные молекулярные массы (кДа) и соответствующие аминокислотные последовательности, показаны в табл. 6.

Таблица 6

Описание различных изоформ CK8

Белковые формы CK8	Предполагаемая ММ (кДа)	Соответствующая последовательность (AA)
E ⁺ (более длинная форма, N-концевые удлинения)	57	1-511
E (полная)	54	1-483
I (неопределенная)	51, 49, 48, 47, 46	?
C (расщепленная на С-конце)	43	Предполагаемая 1-393

E - полная форма CK8, I - неопределенная изоформа CK8, C - укороченная с С-конца изоформа CK8.

В экспериментах, проводимых с помощью вестерн-блоттинга (WB), 5 мкг белков из лизата клеток колоректального рака разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану насыщали раствором TBS-T (Tris-HCl 20 mM, pH 7, NaCl 130 mM, Tween 20 при 0,1%), содержащим 5% молока, затем инкубировали с различными анти-CK8 антителами, разбавленными в растворе TBS-T, содержащем 2,5% молока. Антитела M20 (50 мкг/мл), 1E8 (1/500), mD-A10 (1 мкг/мл) или mD-D6 (1 мкг/мл) инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с мембраной. Первичные антитела выявляли с помощью антимишиного вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (ab97040), (Abcam, France). Результаты показаны на фиг. 1. Изоформы белка CK8 детектировали по-разному в зависимости от тестируемого анти-CK8 антитела. Полноразмерную форму белка CK8 (CK8-E) детектировали с использованием всех антител. Укороченную с С-конца форму белка CK8 (CK8-C) детектировали в высокой степени только с помощью антитела mD-A10 и в слабой степени с помощью антитела M20. Антитело 1E8 или mD-D6 Mab не распознает форму CK8-C. Эти результаты ясно демон-

стрируют, что mD-A10 Mab проявляет специфический профиль реактивности против различных изоформ СК8 по сравнению с другими тестируемыми антителами против СК8.

Конкурентный вестерн-блот-анализ с пептидами СК8.

Для проведения экспериментов по конкурентному связыванию антителом M20 (1 мкг/мл) или мышинные моноклональные антитела, такие как mD-A10 (1 мкг/мл) или mD-D6 (1 мкг/мл), предварительно инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с пептидом 1 или пептидом 2 при молекулярном соотношении 1/100 (одна молекула антитела на 100 молекул пептида) в растворе TBS-T. Затем смесь антитело-пептид приводили в контакт с мембранами в растворе TBS-T, содержащем 2,5% молока, в течение 1 ч для детекции с помощью антимишного вторичного антитела, связанного с HRP. Результаты показаны на фиг. 3. Присутствие пептида 2 уменьшает распознавание всех изоформ СК8 антителом mD-D6 Mab и не препятствует распознаванию изоформ СК8 антителом M20 и антителом mD-A10 Mab. Напротив, присутствие пептида 1 сильно уменьшает распознавание всех изоформ СК8 антителами mD-A10 и mD-D6 Mabs, при этом не препятствует распознаванию изоформ СК8 антителом M20.

Эффект мышинного моноклонального антитела D-A10 на инвазивные способности клеток колоректального рака Isresco-1: анализ *in cellulo* инвазивных способностей раковых клеток путем измерения в режиме реального времени импеданса клеток (система xCELLigence-ACEA Biosciences™).

Прибор для измерения в режиме реального времени xCELLigence (ACEA Biosciences™) основан на величине импеданса, которая пропорциональна фиксации клеток на микроэлектродах. Систему использовали для оценки инвазивных способностей клеток в системе RTCA DP. В этой системе используются планшеты CIM, содержащие 16 лунок. Лунки состоят из нижней и верхней камер. Верхняя камера соединяется с нижней камерой посредством пор с диаметром 8 мкм, которые расположены над микроэлектродами. При оценке инвазивных способностей клеток Isresco-1 нижняя камера содержит культуральную среду, дополненную 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS). Клетки Isresco-1 (20 000 клеток) в присутствии культуральной среды без FBS помещали в верхнюю камеру, содержащую или не содержащую анти-СК8 антитело (M20, mD-A10 или mD-D6 при 50 мкг/мл). Дно этой верхней камеры предварительно покрывали слоем матригеля (Matrigel™, BD biosciences). Во время инвазивного процесса клетки притягивались градиентом FBS, установившимся между нижней и верхней камерами, разложение матригеля позволяло клеткам мигрировать через поры и контактировать с микроэлектродами нижней камеры. Показатель импеданса, генерированного клеточным контактом, измеряли каждые 15 мин в течение 70 ч и записывали с помощью компьютера, соединенного с системой RTCA DP. Результаты тестирования инвазивных способностей клеток представлены на фиг. 4. Процент ингибирования инвазивных способностей клеток Isresco-1 представлен со стандартным отклонением, соответствующим 3 независимым экспериментам. Значительное ингибирование иницированных FBS инвазивных способностей клеток Isresco-1 наблюдали в присутствии антитела M20 или mD-A10, при этом какое-либо воздействие в присутствии mD-D6 отсутствовало.

Анализ на жизнеспособность клеток путем измерения уровней аденозинтрифосфата (АТФ).

Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega, Charbonnières les Bains, France) использовали для определения количества жизнеспособных клеток в культуре на основе количественной оценки присутствующего АТФ в качестве индикатора метаболически активных клеток. Детекция основана на использовании реакции фермента люциферазы для измерения содержания АТФ, которое соответствует количеству жизнеспособных клеток. Через несколько минут после утраты целостности мембраны клетки утрачивали способность синтезировать АТФ и эндогенные АТФазы разрушали любой оставшийся АТФ; таким образом, уровни АТФ стремительно падали. Клеточные культуры (5×10^4 клеток/мл) инкубировали в течение 72 ч отдельно или в присутствии антител (B-Z1, B-E4, M20, 1E8, D-D6, D-A10), тестировали при 10 мкг/мл, а затем разбавляли в соотношении 1/10 (фиг. 5). Контроль изотипа Mabs (IgG1-B-Z1, IgG2a-B-E4) получали от фирмы Diaclone (Besancon, France). Реагент CellTiter-Glo® добавляли непосредственно в клетки, содержащиеся в культуре, в соотношении 50 мкл реагента к 200 мкл культуральной среды. Аналитические планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и биолюминесцентный сигнал записывали с помощью стандартного мультилуночного флуориметра Mithras LB940 (Berthold, Thoiry, France). Результаты показаны на фиг. 5. Только антитело Mab 1E8 против СК8 ингибирует пролиферацию клеток Isresco-1.

Количественное определение накопления клеток, позитивных по активированной каспазе-3, в ксенотрансплантате опухоли Isresco-1 путем иммуногистохимического окрашивания.

Ткани изолировали из ксенотрансплантатов опухолей Isresco-1 мышей, подвергнутых или не подвергнутых лечению антителом Mab при 30 мг/кг. Оценивали эффективность антитела M20, mD-A10 или mD-D6 в отношении индукции активации каспазы-3. Для окрашивания образцы тканей фиксировали в 10%-м забуференном формалине и заливали в парафин. Из тканей, фиксированных формалином и залитых в парафин, делали срезы толщиной 4 мкм в соответствии с общепринятыми процедурами. Иммуногистохимический анализ проводили на автоматическом иммуноштейнере (Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France) с использованием набора DABmap Kit согласно инструкциям производителя. После проведения процедур демаскировки с помощью буфера Cell Conditioning 1 (CC1) срезы инкубировали с кро-

личьим моноклональным антителом к расщепленной форме каспазы-3 (разведение 1:200, клон 5A1E, сигнальная система клетки). Окрашивание визуализировали с помощью раствора DAB, содержащего 3,3'-диаминобензидин, в качестве хромогенного субстрата. В заключение, срезы контрокрашивали гематоксилином Gill. Количество клеток на мм^2 , позитивных по активированной каспазе-3, определяли с помощью программного обеспечения Histolab, соединенного с камерой, после визуализации с помощью микроскопа. Для каждой опухоли подсчет количества клеток, позитивных по активированной каспазе-3, осуществляли на поверхности площадью 2 мм^2 . Из анализа исключали некротическую область опухоли и фиброзную капсулу. На фиг. 6А показаны результаты определения количества клеток, позитивных по активированной каспазе-3. Количество клеток, позитивных по активированной каспазе-3, показано со стандартным отклонением, соответствующим трем мышам на группу. На фиг. 6В показан пример иммуногистохимического анализа для толстых срезов тканей, полученных от не подвергнутых лечению животных и животных, подвергнутых лечению антителами mD-A10 Mab, M20 и mD-D6 Mabs. Как видно на фиг. 6А, количество клеток, позитивных по активированной каспазе-3, значительно более высокое в опухолях от животных, получавших антитело mD-A10 Mab, по сравнению с необработанными животными. Значительного эффекта не наблюдалось у животных, получавших антитело M20 или mD-D6 Mabs. Этот результат четко показывает, что антитело mD-A10 Mab способно индуцировать апоптоз, связанный с активацией каспазы-3 в клетках Isreco-1 *in vivo*, тогда как антитело M20 или mD-D6 Mab не инициирует расщепление каспаз. Эти результаты демонстрируют, что M20 и mD-A10 проявляют свой эффект против роста опухолей посредством особого механизма. Антитело mD-A10 Mab определяется как агонистическое Mab, зависящее от запускаемого каспазой-3 индукции апоптоза, тогда как M20 Mab не зависит от этого пути.

Эффект анти-CK8 антитела на рост опухолевых клеток Isreco-1 колоректального рака, подкожно имплантированных мышам.

Клетки Isreco-1 (10×10^6) подкожно инъецировали 12 мышам SCID CB17. Через 15 дней опухоли достигали объема $100\text{-}150 \text{ мм}^3$. В этот момент мышей разделяли на 4 группы по 3 мыши. Каждая группа получала или не получала специфическое лечение путем интраперитонеальной инъекции, выполняемой на противоположной от опухоли стороне. Один раз в неделю в течение 4 недель (дни 15, 22, 29 и 36) мыши получали или не получали инъекцию 30 мкг/кг антитела M20, mD-A10 Mab или mD-D6 (фиг. 7). У каждой мыши два раза в неделю измеряли объем опухоли на протяжении эксперимента. На графике показан средний объем опухоли в каждой группе мышей со стандартным отклонением, соответствующим трем мышам на группу. Как показано на фиг. 7, антитело M20 или mD-A10 ингибировало рост клеток Isreco-1 колоректального рака, подкожно имплантированных мышам, тогда как mD-D6 не контролировало развитие опухоли.

Дозозависимый эффект mD-A10 Mab на рост опухолевых клеток Isreco-1 колоректального рака, подкожно имплантированных мышам.

Фрагменты опухоли Isreco-1, полученной из клеток Isreco-1 колоректального рака, имплантировали подкожно 18 мышам SCID CB17. Через 15 дней опухоли достигали объема $100\text{-}150 \text{ мм}^3$. В этот момент мышей разделяли на шесть групп по 3 мыши. Каждая группа получала или не получала специфическое лечение путем интраперитонеальной инъекции, выполняемой на противоположной от опухоли стороне. Один раз в неделю в течение 4 недель (дни 15, 22, 29 и 36) мыши получали или не получали инъекцию 1, 3, 10, 30 или 60 мг/кг mD-A10 Mab. У каждой мыши два раза в неделю измеряли объем опухоли на протяжении эксперимента. На графике показан средний объем опухоли в каждой группе мышей со стандартным отклонением, соответствующим трем мышам на группу. Результаты представлены на фиг. 8. Ингибирование роста клеток Isreco-1 колоректального рака, подкожно имплантированных мышам, наблюдалось даже при самой низкой концентрации Mab, составляющей 1 мг/кг .

Эффект mD-A10 Mab на рост опухолевых клеток колоректального рака HCT116, подкожно имплантированных мышам.

Клетки HCT116 (10×10^6) подкожно инъецировали 12 мышам SCID CB17. Через 6 дней опухоли достигали объема $100\text{-}150 \text{ мм}^3$. В этот момент мышей разделяли на четыре группы по три мыши. Каждая группа получала или не получала специфическое лечение путем интраперитонеальной инъекции, выполняемой на противоположной от опухоли стороне. Один раз в неделю в течение 3 недель (дни 6, 13 и 20) мыши получали или не получали инъекцию 30 мг/кг анти-CK8 антитела (M20, mD-A10 или mD-D6). У каждой мыши два раза в неделю измеряли объем опухоли на протяжении эксперимента. На графике показан средний объем опухолей для каждой группы мышей со стандартным отклонением, равным 3 мышам на группу. Как показано на фиг. 7, mD-A10 ингибировало на самом высоком уровне рост клеток Isreco-1 колоректального рака, подкожно имплантированных мышам, по сравнению с антителом M20, тогда как mD-D6 не контролировало развитие опухоли.

Дозозависимый эффект концентрации mD-A10 Mab на рост опухолевых клеток колоректального рака HCT116, подкожно имплантированных мышам.

Клетки HCT116 (10×10^6) подкожно инъецировали 18 мышам SCID CB17. Через 10 дней опухоли достигали объема $100\text{-}150 \text{ мм}^3$. В этот момент мышей разделяли на шесть групп по три мыши. Каждая

группа получала или не получала специфическое лечение путем интраперитонеальной инъекции на противоположной стороне от опухоли. Один раз в неделю в течение трех недель (дни 10, 17 и 24) мыши получали или не получали 1, 3, 10, 30 или 60 мг/кг mD-A10 Mab. Для каждой мыши два раза в неделю измеряли объем опухоли на протяжении эксперимента. На графике показан средний объем опухолей в каждой группе мышей со стандартным отклонением, равным трем мышам на группу. Результаты показаны на фиг. 10.

Получение гуманизированного антитела (Mab) против СК8 из mD-A10 Mab.

ДНК, кодирующую антитело, выделяли и секвенировали с использованием общепринятых процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридомы служили в качестве предпочтительного источника такой ДНК.

Превращение мышинного антитела (Mab) в нативное химерное антитело (Mab).

кДНК, соответствующую вариательной области из гибридомы, получали с использованием двух подходов. Первый подход состоял в использовании в PCR наборе вырожденных праймеров на основе N-концевой аминокислотной последовательности, созданных после N-концевого секвенирования. Второй подход состоял в использовании в PCR набора вырожденных праймеров, генерированных с помощью базы данных праймеров IMGT®, и специфических праймеров, описанных ранее (Essono et al., *J Immunol Methods*. 2003; 203: 279:25-66, Wang et al., *Mol Immunol*. 1991; 28:1387-97). Последовательность N-концевой вариательной области определяли с использованием способа деградации Эдмана. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора Tri Reagent kit в соответствии с протоколом, описанным поставщиком Sigma. Амплифицированные фрагменты VL и VH клонировали в клонирующий вектор TOPO-TA (Invitrogen) для анализов последовательности посредством способа терминации дидеокси (Sanger et al., *Nature*. 1977; 265:687-95). Затем конструкции вариантов антител амплифицировали с помощью PCR и клонировали в экспрессионный вектор.

Положения пронумерованы в соответствии с IMGT®, индексом Kabat® и общепринятыми системами нумерации (Common Numbering Systems) (Идентичные аминокислотные последовательности в V-области и сегменты последовательностей в антителах различных видов). Анализировали относительные вклады генов VH и VL, мини-генов и определяющих комплементарность участков в связывание антител-объединяющих участков (Kabat et al., *NIH Publ*. 1991; NO: 91-3242, Vol. 1, 647-669).

Нуклеотидные или аминокислотные последовательности химерного D-A10 Mab показаны в перечне последовательностей:

нуклеотидная последовательность вариательной области мышинной легкой цепи mD-A10 Mab (SEQ ID NO: 30) и ее производная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 31);

нуклеотидная последовательность вариательной области мышинной тяжелой цепи mD-A10 Mab (SEQ ID NO: 32) и ее производная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 33);

нуклеотидная последовательность константной области человеческой тяжелой цепи chD-A10 Mab (SEQ ID NO: 48) и ее производная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 47);

нуклеотидная последовательность константной области человеческой легкой цепи chD-A10 Mab (SEQ ID NO: 50) и ее производная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 49).

CDR- и FR-области антитела определяли в соответствии с различными подходами к нумерации, такими как IMGT (ImMunoGeneTics Information System® <http://imgt.cines.fr>), Kabat или Common Numbering System. Однако определенные согласно IMGT CDR для заданного антитела необязательно являются идентичными CDR, определенным с помощью других систем нумерации. CDR и каркасные области вариательных доменов были идентифицированы автором изобретения с помощью систем нумерации IMGT.

Превращение химерного Mab в гуманизированное Mab.

Гуманизированную H- и L-цепь создавали с использованием прививания CDR с помощью PCR. Для создания гуманизированного антитела, в котором CDR мышинного моноклонального антитела привиты на человеческое антитело, предпочтительно получить высокую гомологию между вариательной областью мышинного моноклонального антитела и вариательной областью человеческого антитела. Таким образом, V-области H-цепи и L-цепи мышинного моноклонального антитела против человеческого СК8 сравнивали с V-областью всех известных человеческих антител с использованием программного обеспечения IMGT/DomainGapAlign. Когда мышинное антитело гуманизировано с использованием общепринятых способов, аминокислотная последовательность некоторых каркасных участков (FR) V-области мышинного антитела, поддерживающих CDR, по желанию, может быть привита на FR человеческой V-области.

Для обеих гуманизированных V-областей H-цепи и L-цепи можно выбрать V-области (IGKV2-28*01, IGHV13-74*01) и J-области (IGKJ2*01, IGHJ4*01) L- и H-цепи соответственно, имеющие высокую гомологию с V-областью и J-областью H- и L-цепи mD-A10. Вариательные области H- и L-цепи Hz D-A10 амплифицировали с помощью PCR и клонировали в экспрессионный вектор p3U, содержащий константную область человеческого IgG1.

В случае антител с привитыми мышинными CDR активность связывания снижается при прививании

аминокислотной последовательности CDR только в человеческое антитело. Для того, чтобы избежать этого снижения, поскольку аминокислотные остатки в FR различаются между человеческим антителом и мышинным антителом, вместе с аминокислотной последовательностью CDR прививают аминокислотные остатки, которые, как полагают, оказывают влияние на активность связывания. Таким образом, в этом примере была сделана попытка идентифицировать аминокислотные остатки в FR, которые, как полагают, оказывают влияние на активность связывания.

В табл. 3 показаны последовательности CDR для VH и VL антитела Hz D-A10 Mab после прививания SDR.

Реактивность Mab в отношении пептидов CK8, определенная с помощью ELISA.

Пептиды CK8, конъюгированные или не конъюгированные с бычьим сывороточным альбумином (BSA) через SH-группу С-концевого цистеина, иммобилизовали (0,5 или 1 мкг/мл соответственно) на дне лунок 96-луночного планшета в течение ночи при комнатной температуре. Несвязанные пептиды удаляли, осуществляя промывку очищенной водой, дополненной Tween (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Затем лунки насыщали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 5% BSA, в течение 2 ч при комнатной температуре (RT). Затем планшеты промывали очищенной водой, дополненной Tween. Связывание Mab с покрывающими лунки пептидами тестировали при различных концентрациях Mab после инкубации в течение 2 ч при RT в PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), дополненном 1%-м бычьим сывороточным альбумином (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Несвязанные Mabs удаляли, осуществляя промывку очищенной водой, дополненной Tween. Затем связанные Mab выявляли с помощью козьего антимышиного вторичного IgG-антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Biorad, France). Поглощение считывали при длине волны 450 нм и корректировали при 630 нм. Специфические требования для различных экспериментов подробно описаны ниже.

Реактивность MAb в отношении различных пептидов 1 (SEQ ID № 1), 2 (SEQ ID № 2), 3 (SEQ ID № 3), 4 (SEQ ID № 4) и 17 (SEQ ID № 17) человеческого CK8.

Пептиды 1, 2, 3 или 4 человеческого CK8, модифицированные путем добавления С-концевого цистеина, конъюгировали с BSA через SH-группу С-концевого цистеина и иммобилизовали на дне 96-луночного планшета. Полная последовательность человеческого CK8, содержащая 483 аминокислоты (aa) (ref Uni-ProtKB P05787), показана на фиг. 11. Положения последовательностей пептидов 1, 2, 3 и 4 указаны серыми и черными стрелками на последовательности человеческого CK8:

Пептид 1 (SEQ ID № 1): AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD-C (aa 338-aa 366).

Пептид 2 (SEQ ID № 2): AEQRGELAIKDANAKLSELE-C (aa 338-aa 357).

Пептид 3 (SEQ ID № 3): AALQRAKQD-C (aa 358-aa 366).

Пептид 4 (SEQ ID № 4): SELEAALQRAKQD-C (aa 354-aa 366).

Пептид 17 (SEQ ID № 17): C-AIKDANAKLSELEAALQRAKQD (aa 345-aa 366).

Различные концентрации Mab (от 10 мкг/мл, затем разведенные 1/10) инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с пептидом 1, пептидом 2, пептидом 3, пептидом 4 или пептидом 17. Величины оптической плотности (OD) считывали при 450 нм и корректировали при 630 нм. Результаты показаны на фиг. 12 и обобщены в табл. 7 ниже. Эти результаты четко демонстрируют профиль реактивности mD-A10, который отличается от профиля реактивности антитела M20.

Таблица 7

Реактивность Mab в отношении покрывающих лунки пептидов 1-4 и пептида 17, конъюгированных с BSA

Пептид (№)	Последовательность CK8 (aa)	Реактивность MAb в отношении покрывающих лунки пептидов, конъюгированных с BSA	
		M20	D-A10
Пептид 1	338-AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD-C-366	+	+++
Пептид 2	338-AEQRGELAIKDANAKLSELE-C-357	-	-
Пептид 3	358-AALQRAKQD-C-366	-	-
Пептид 4	354-SELEAALQRAKQD-C-366	-	++
Пептид 17	345-C-AIKDANAKLSELEAALQRAKQD-366	+	+++

Уровень реактивности Mab в отношении распознавания или не распознавания покрывающих лунки конъюгированных с BSA пептидов 1, 2, 3, 4 или 17 соответственно указан с помощью знаков, таких как +++ (сильная), ++ (средняя), + (слабая) или - (отсутствует).

Реактивность MAb в отношении различных покрывающих лунки неконъюгированных пептидов 1, 5-28 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 28) человеческого CK8.

Неконъюгированные пептиды 1, 5-28 человеческого CK8 иммобилизовали (2 мкг/мл) на дне 96-луночного планшета. Различные концентрации Mab (от 10 мкг/мл затем разведенные 1/10) инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре отдельно или с каждым тестируемым пептидом. Величины оптической плотности (OD) считывали при 450 нм и корректировали при 630 нм. Результаты показаны на фиг. 13A (относятся к mD-A10) или на фиг. 13B (относятся к M20). Сравнительный анализ показан в

табл. 8 ниже. Эти результаты ясно демонстрируют отличие профиля реактивности mD-A10 от профиля реактивности антитела M20 в отношении тестируемой панели пептидов.

Таблица 8

**Реактивность Mab в отношении различных
покрывающих лунки неконъюгированных пептидов**

Пептид (N°)	Последовательность СК8 (aa)	Реактивность Ab в отношении покрывающих лунки свободных пептидов	
		D- A10	M20
Пептид 1	338-AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD-C-366	+++	+
Пептид 5	338-AEQRGELAIKDANAKLSELEAALQRAKQD-366	+++	+
Пептид 6	358-AALQRAKQD-366	-	-
Пептид 7	357-EAALQRAKQD-366	-	-
Пептид 8	356-LEAALQRAKQD-366	-	-
Пептид 9	355-ELEAALQRAKQD-366	-	-
Пептид 10	354-SELEAALQRAKQD-366	-	-
Пептид 11	353-LSELEAALQRAKQD-366	++	-
Пептид 12	352-KLSELEAALQRAKQD-366	++	-
Пептид 13	351-AKLSELEAALQRAKQD-366	++	-
Пептид 14	350-NAKLSELEAALQRAKQD-366	+++	-
Пептид 15	349-ANAKLSELEAALQRAKQD-366	+++	-
Пептид 16	348-DANAKLSELEAALQRAKQD-366	+++	-
Пептид 17	345-C-AIKDANAKLSELEAALQRAKQD-366	+++	-
Пептид 18	345-AIKDANAKLSELEAALQRAKQ-365	+++	-
Пептид 19	345-AIKDANAKLSELEAALQRAK-364	+++	-
Пептид 20	345-AIKDANAKLSELEAALQRA-363	+++	-
Пептид 21	345-AIKDANAKLSELEAALQR-362	+++	-
Пептид 22	345-AIKDANAKLSELEAALQ-361	+++	-
Пептид 23	345-AIKDANAKLSELEAAL-360	+++	-
Пептид 24	345-AIKDANAKLSELEAA-359	-	-
Пептид 25	345-AIKDANAKLSELEA-358	-	-
Пептид 26	345-AIKDANAKLSELE-357	-	-
Пептид 27	345-AIKDANAKLSEL-356	-	-
Пептид 28	345-AIKDANAKLSE-355	-	-

Уровень реактивности Mab в отношении распознавания или не распознавания покрывающих лунки неконъюгированных пептидов соответственно указан с помощью знаков, таких как +++ (сильная), ++ (средняя), + (слабая) или - (отсутствует).

Эффект свободных пептидов 1, 5-28 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 28) в отношении распознавания антителом mD-A10 Mab покрывающего лунки BSA-конъюгированного пептида 1 или 17.

При проведении конкурентных анализов mD-A10 Mab с различными пептидами СК8 смесь пептид-антитело инкубировали в течение 30 мин перед помещением в присутствие пептида для детекции того, что он был иммобилизован на дне лунок. Антитело mD-A10 Mab помещали в присутствии пептидов 1, 5-28 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 28) либо для распознавания BSA-конъюгированного пептида 1 (SEQ ID NO: 1), либо для распознавания BSA-конъюгированного пептида 17 (SEQ ID NO: 17).

Пептид 1 человеческого СК8, модифицированный путем добавления цистеина в С-концевое положение, конъюгировали с BSA через SH-группу его С-концевого цистеина и иммобилизовали на дне 96-луночного планшета. Мышиное моноклональное антитело D-A10 при концентрации 1 нг/мл инкубировали в течение 30 мин в присутствии пептидов 1,5-28 при различных концентрациях (10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл). Затем добавляли смесь пептид-антитело или только антитело и выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре с покрывающим лунки BSA-конъюгированным пептидом 1 или с покрывающим лунки BSA-конъюгированным пептидом 17 и использовали для детекции с помощью ELISA. Величины оптической плотности (OD) считывали при 450 нм и корректировали при 630 нм. Результаты показаны на фиг. 14 для покрывающего лунки BSA-конъюгированного пептида 1 или на фиг. 15 для покрывающего лунки BSA-конъюгированного пептида 17.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или фрагмент антитела, где указанное антитело или его фрагмент специфически связывает человеческий цитокератин-8 (СК8), при этом указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, при этом

CDR-H1 содержит последовательность SEQ ID NO: 37; и CDR-H2 содержит последовательность SEQ ID NO: 38; и CDR-H3 содержит последовательность SEQ ID NO: 39; и

легкую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом

CDR-L1 содержит последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR-L2 содержит последовательность SEQ ID NO: 35; и CDR-L3 содержит последовательность SEQ ID NO: 36.

2. Антитело или фрагмент антитела по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело, сохраняющее свойство связывания с человеческим СК8 родительского антитела.

3. Антитело или фрагмент антитела по п.2, отличающееся тем, что содержит указанные CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3.

4. Антитело или фрагмент антитела по п.1, отличающееся тем, что оно содержит цепь VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 31, и цепь VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 33.

5. Гуманизированное антитело или фрагмент антитела, где указанное антитело или его фрагмент специфически связывают человеческий цитокератин-8 (СК8), при этом указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-H1', CDR-H2' и CDR-H3', при этом

CDR-H1' содержит последовательность SEQ ID NO: 40; и

CDR-H2' содержит последовательность SEQ ID NO: 41; и

CDR-H3' содержит последовательность SEQ ID NO: 39; и

легкую цепь, содержащую следующие три CDR, соответственно CDR-L1', CDR-L2' и CDR-L3', при этом

CDR-L1' содержит последовательность SEQ ID NO: 42; и

CDR-L2' содержит последовательность SEQ ID NO: 35; и

CDR-L3' содержит последовательность SEQ ID NO: 36.

6. Антитело или фрагмент антитела по п.5, отличающееся тем, что оно содержит цепь VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 44, и цепь VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 43.

7. Антитело или фрагмент антитела по п.5 или 6, отличающееся тем, что оно содержит переменные области, кодируемые полинуклеотидами, имеющими нуклеотидную последовательность переменной области мышиной легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 46, и нуклеотидную последовательность переменной области мышиной тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 45.

8. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанный фрагмент антитела представляет собой Fv, Fab, F(ab')₂, scFv.

9. Применение моноклонального антитела или фрагмента антитела по любому из предшествующих пунктов для лечения опухолей, клетки которых экспрессируют на своей поверхности белок СК8.

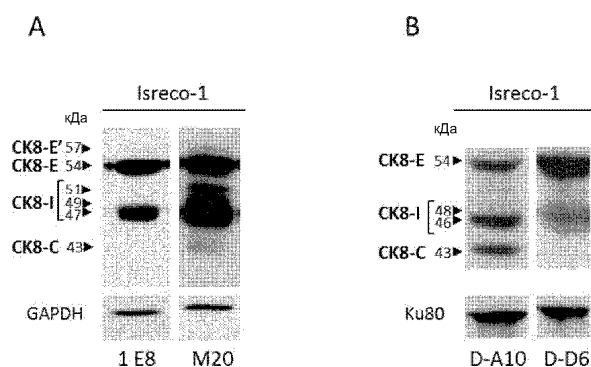
10. Применение по п.9, в котором рак выбирают из колоректального рака, рака яичников, рака молочной железы, рака легких, рака яичка, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака лимфатических узлов, рака почек, рака головы и шеи.

11. Применение по п.9, в котором рак представляет собой инвазивный рак.

12. Применение по п.11, в котором инвазивный рак представляет собой инвазивный колоректальный рак.

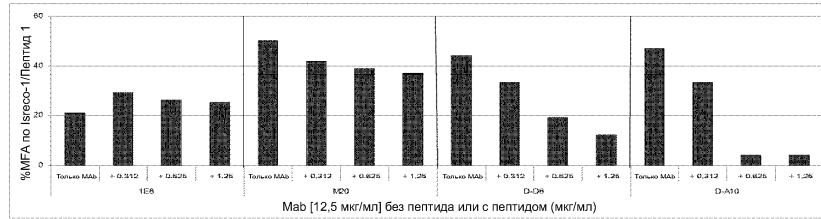
13. Антигенный пептидный эпитоп человеческого СК8 для получения антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-8, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 29.

14. Противораковая фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-8 и подходящий фармацевтический носитель.

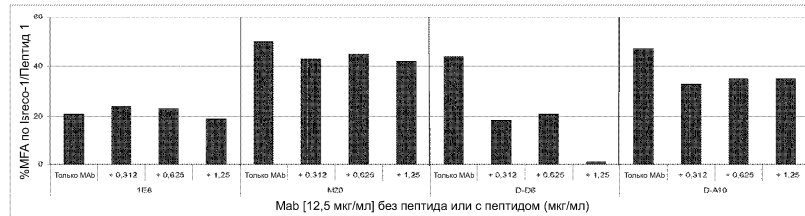


Фиг. 1

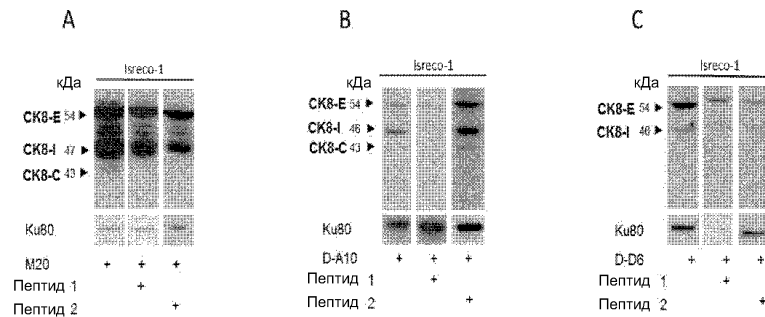
A.



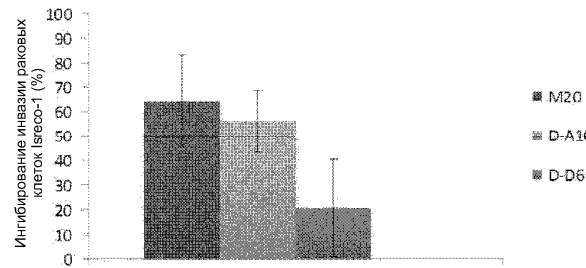
B.



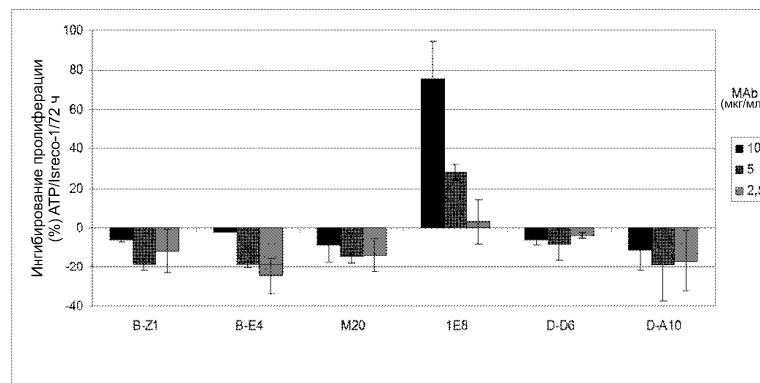
Фиг. 2



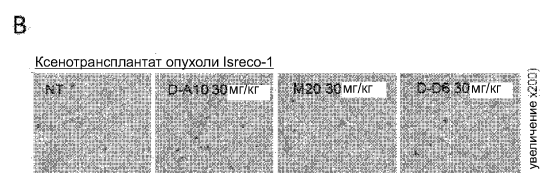
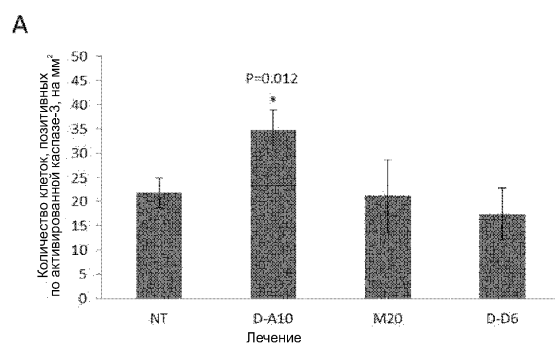
Фиг. 3



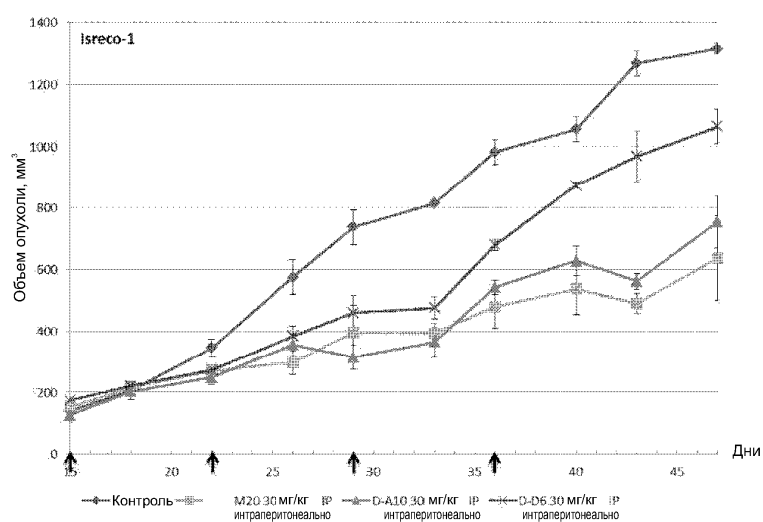
Фиг. 4



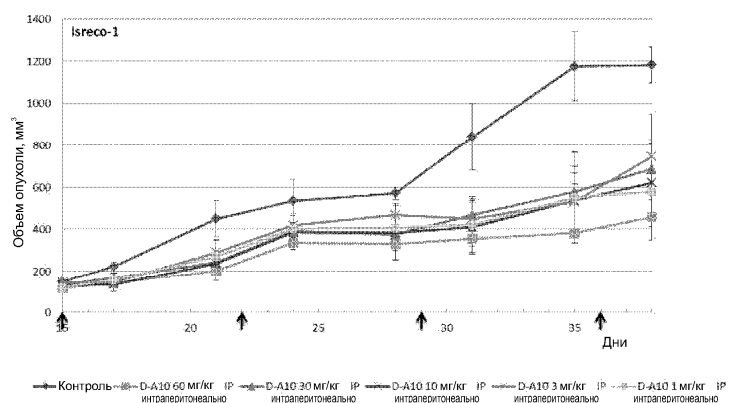
Фиг. 5



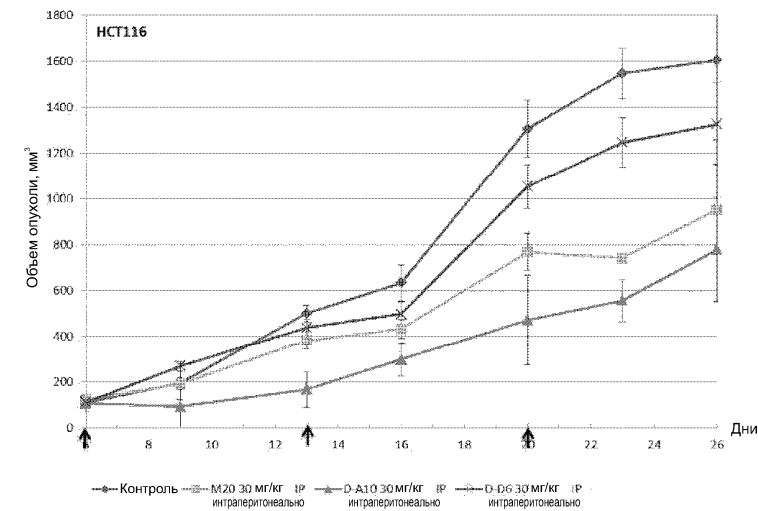
Фиг. 6



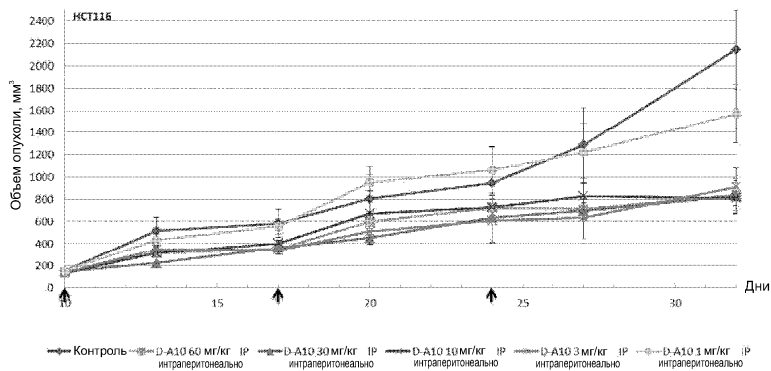
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

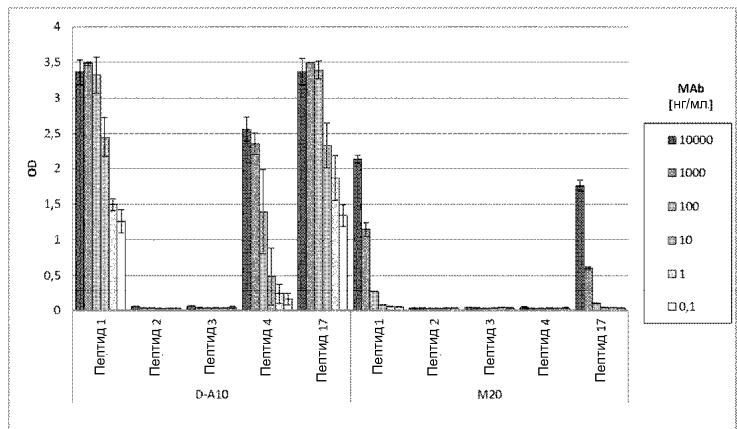


Фиг. 10

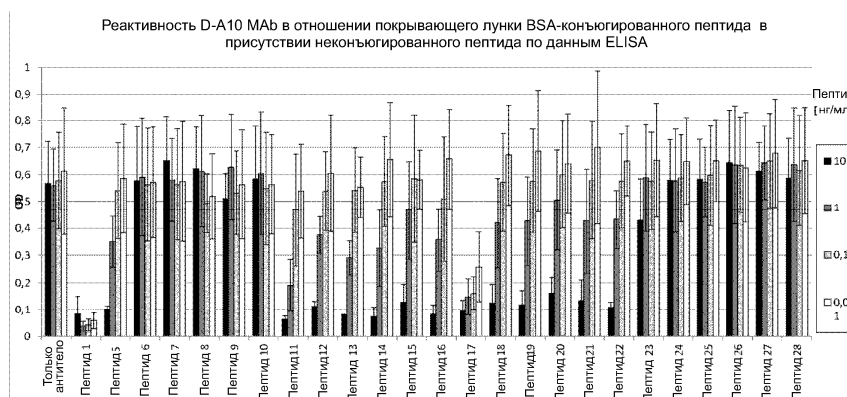
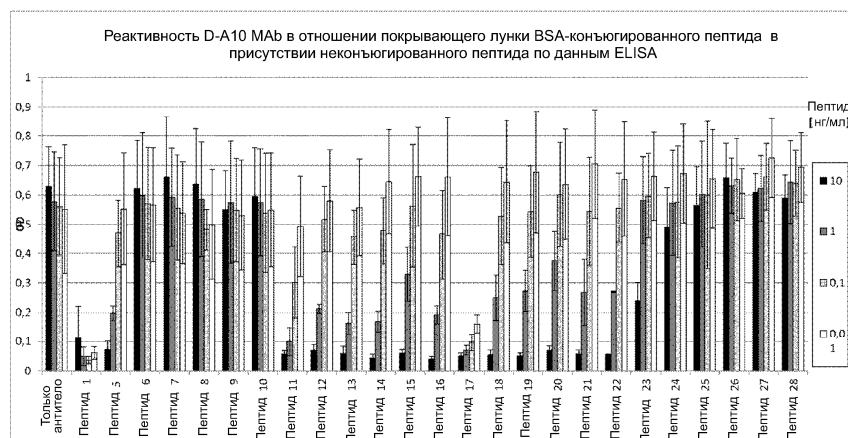
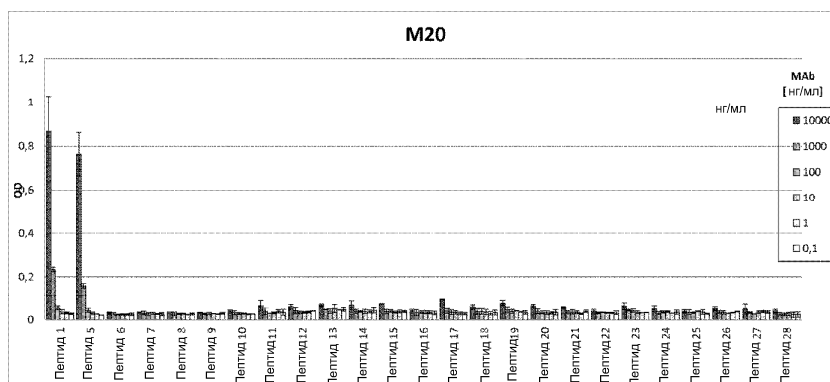
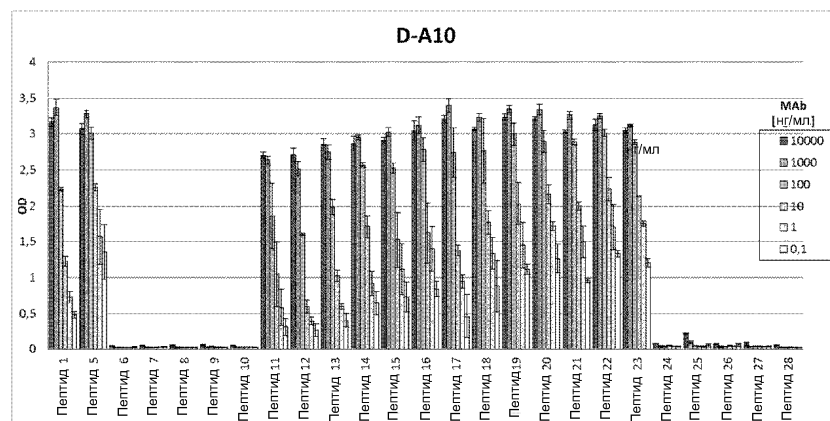
MSIRVTQKSYKVSTSGPRAFSSRSYTSRPGSRSSSSFSR VGSSNFRGGLGGGYGGASGM
GGITAVTVNQSLSPVLVLEVDPNIAQVTRQEKQIKTLNNKFASFIDKVR FLEQNKMLE
TKWSLLQQQKTARSNMDNMFESYINNLRRLLETLGQEKLEAELGNMQGLVEDFNKYE
DEINKRTEME NEFVLIKKDVDEAYMNKVELESRLEGLTDEINFLRLYEE EIRELSQIS
DTSVVLMDN SRSLDMSIIAEVKAQYEDI ANRSRAEAE MYQIKYEELQSLAGKHGDDL
RRTKTEISEMNRNISRLOAEIEGLKQGRASLEAAIAAEQRGELAIKDANAKLSELEAAL
QRAKQDMARQLREYQELMNVKLALDIEIATYRKLEGEESPLESGMQNMMSIHTKTTSGYA
GGLSSAYGGLTSPGLSYSLGSSFGSGAGSSSFSRTSSRAVVKKIETRDGKLVSESDV

LPK

Фиг. 11



Фиг. 12



```

<----- L-FR1-IMGT -----
AAC ATT GTT ATG ACC CAG GCC GCA CCC TCT GTA COT GTC ACT COT GGA GAG TCA GTA
N I V M T Q A A P S V P V T P G E S V

-----> L-CDR1-IMGT <-----
TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT AAG AGT CTT CTG TAT AGT AAT GGC AAC ACT TAT TTG
S I S C R S S K S L L Y S N G N T Y L

----- L-FR2-IMGT -----> L-CDR2-IMGT
TAT TGG TTC CTG CAG AGG CCA GGC CAG TCT COT CAG GGC CTG ATA TAT TAT ATG TCC
Y W F L Q R P G Q S P Q R L I Y Y M S

<----- L-FR3-IMGT -----
AAC CTT GCC TCA GGA GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGA GGG TCA GGA ACT GAT TTC
N L A S G V P D R F S G R G S G T D F

----->
ACA CTG AGA ATC AGT AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTG GGT GTT TAT TAC TGT ATG CAA
T L R I S R V E A E D V G V Y Y C M Q

----- L-CDR3-IMGT -----
AGT CTA GAA TAT COT TTC ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTC GAG ATC AAA
S L E Y P F T F G G G T K L E I K

```

Фиг. 16

```

<----- H-FR1-IMGT -----
GAA GTG CAG CTG TTG GAG ACT GGA GGA GGC TTG GTG CAA CCG GGG GGG TCA CGG GGA
E V Q L L E T G G G L V Q P G G S R G

-----> H-CDR1-IMGT <-----
CTC TCT TGT GAA GGC TCA GGG TTT ACT TTT AGT GGC TTC TGG ATG AGC TGG GTT CGA
L S C E G S G F T F S G F W M S W V R

----- H-FR2-IMGT -----> H-CDR2-IMGT
CAG ACA CCT GGG AAG ACC CTG GAG TGG ATT GGA GAC ATT AAT TCT GAT GGC AGT GCA
Q T P G K T L E W I G D I N S D G S A

<----- H-FR3-IMGT -----
ATA AAA TAC GCA CCA TCC ATA AAG GAT CGA TTC ACT ATC TTC AGA GAC AAT GAC AAG
I K Y A P S I K D R F T I P R D N D K

-----
AGC ACC CTG TAC CTG CAG ATG AGC AAT GTG CGA TCT GAG GAC ACA GCC ACG TAT TTC
S T L Y L Q M S N V R S E D T A T Y F

----> H-CDR3-IMGT
TGT ATC GCC CAT TAC TCC GGT GGG GGG TTT GCT TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCG GTC
C I A H Y S G G G F A Y W G Q G T S V

ACC GTC TCC TCA
T V S S

```

Фиг. 17

```

<----- H-FR1-IMGT -----
GAA GTA CAA TTG GTA GAA TCA GGT GGT GGT TTG GTT CAG CCA GGA GGA TCA CTG AGA
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R

-----> H-CDR1-IMGT <-----
CTG TCC TGC GCT GCA AGC GGC TTT ACC TTC TCT AGC TAC TGG ATG TCT TGG GTC CGG
L S C A A S G F T F S S Y W M S W V R

----- H-FR2-IMGT -----> H-CDR2-IMGT
CAA GCC CCA GGG AAG GGA CTG GTG TGG GTG AGC GAT ATT AAT AGT GAC GGC TCT TCT
Q A P G K G L V W V S D I N S D G S S

<----- H-FR3-IMGT -----
ACT AAG TAT GCT GAT AGT GTC AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCA CGA GAC AAC GCC AAG
T K Y A D S V K G R F T I S R D H A K

-----
AAC ACC TTG TAC CTC CAG ATG AAC TCT TTG AGA GCT GAG GAT ACA GCA GTG TAT TAC
N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y

--> H-CDR3-IMGT
TGT ATC GCC CAC TAC TCA GGG GGA GGC TTT GCT TAC TGG GGT CAA GGC ACA CTC GTG
C I A H Y S G G G F A Y W G Q G T L V

ACA GTC TCC TCT
T V S S

```

Фиг. 18

```

<----- L-FR1-IMGT -----
GAT ATT GTA ATG ACT CAA GCT CCA CTC TCC TTG CCT GTA ACT CCT GGA GAG CCC GCT
D I V M T Q A P L S L P V T P G E P A

-----> L-CDR1-IMGT <-----
TCT ATT AGC TGT AGG AGT AGT AAA AGC CTG CTT TAC AGT AAT GGT TAC AAT TAC CTG
S I S C R S S K S L L Y S N G Y N Y L

----- L-FR2-IMGT -----> L-CDR2-IMGT
TAC TGG TTT TTG CAG AAG CTT GGA CAG TCA CCC CAG CTC CTC TAT TAT ATG TCT
Y W F L Q K P G Q S P Q L L I Y Y M S

<----- L-FR3-IMGT -----
AAC TTG GCC AGT GGT GTC CCA GAC CGT TTT AGT GGC AGC GGC TCA GGC ACC GAC TTT
N L A S G V P D R F S G S G S G T D F

----->
ACC CTT AAG ATC AGC CGA GTC GAG GCT GAA GAC GTA GGA GTG TAC TAC TGT ATG CAG
T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q

L-CDR3-IMGT
AGT CTT GAG TAT CCA TTC ACC TTC GGG CAG GGC ACC AAG CTC GAA ATA AAG
S L E Y P F T F G Q G T K L E I K

```

Фиг. 19

```

-----
GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S
CH1
GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG
G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T
GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAG ACC TTC CCG GGT GTC CTA
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTC GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L
GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
шарнирная область
AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
K K V E P K S C D K T H T C P P C P A
CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
CH2
CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E
GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K
ACA AAG CCG GCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC
T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T
GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA
V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GCG CAG CCC CGA GAA
A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S
CH3
CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC
L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S
AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC
S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
L S L S P G K *

```

Фиг. 20

```

CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA
R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K
TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA
S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K
GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA
V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA
E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K
CCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC
A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S
TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG
S P V T K S F N R G E C *

```

Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2