



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.03

(21) Номер заявки
201892313

(22) Дата подачи заявки
2017.04.18

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CLEVER-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 20165335; 20165336

(32) 2016.04.18

(33) FI

(43) 2019.03.29

(86) PCT/FI2017/050285

(87) WO 2017/182705 2017.10.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФАРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ОЙ
(FI)

(72) Изобретатель:
Максимов Микаэль, Ялканен Маркку,
Вайнио Марита (FI)

(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(56) Senthil Palani: "CLEVER-1 AS AN IMMUNE SUPPRESSIVE MOLECULE", University of Turku, 18 March 2016 (2016-03-18), pages 1-72, XP055384491, ISBN: 978-951-29-6409-3, Retrieved from the Internet: URL: https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/120719/AnnalesD1222DSenthilPalani_Thesis.pdf?sequence=2 [retrieved on 2017-06-23], Tab. 2; Tab. 3; Tab. 4; p. 43, 2; p. 45, last full; p. 46, 1-2; p. 49; p. 52, last; p. 53 1; p. 54, last
WO-A1-2010122217

WO-A2-03057130

M. KARIKOSKI ET AL.: "Clever-1/Stabilin-1 Controls Cancer Growth and Metastasis", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, no. 24, 15 December 2014 (2014-12-15), pages 6452-6464, XP055384480, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1236, abstract

SENTHIL PALANI ET AL.: "Stabilin-1/CLEVER-1, a type 2 macrophage marker, is an adhesion and scavenging molecule on human placental macrophages: Innate immunity", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 7, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 2052-2063, XP055384527, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.201041376, abstract

MARIKA KARIKOSKI ET AL.: "Clever-1/Stabilin-1 regulates lymphocyte migration within lymphatics and leukocyte entrance to sites of inflammation: Innate immunity", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 39, no. 12, 14 October 2009 (2009-10-14), pages 3477-3487, XP055384536, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.200939896, abstract

VAHIDEH AHMADZADEH ET AL.: "Antibody Humanization Methods for Development of Therapeutic Applications", MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, vol. 33, no. 2, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 67-73, XP055385027, ISSN: 2167-9436, DOI: 10.1089/mab.2013.0080, the whole document

(57) Изобретение относится к средству и гуманизированному антителу или одноцепочечному Fv, или фрагменту Fab, способным связываться с CLEVER-1 человека, узнающим эпитоп CLEVER-1, который не является непрерывным и содержит последовательности: PFTVLVPSVSSFSSR и QEITVTFNQFTK. Это изобретение относится также к средству, способному связываться с эпитопом CLEVER-1 человека, для применения для прекращения индуцированной опухолью или антигеном иммуносупрессии. Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, и пригодный наполнитель.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к средствам, специфическим для белка CLEVER-1 посредством узнавания специфического эпитопа CLEVER-1, и к их применениям.

Уровень техники изобретения

Содержание публикаций и других материалов, применяемых в настоящем описании для освещения уровня техники для изобретения, и в частности, случаев сообщения дополнительных подробностей применительно к практике, приведено в качестве ссылки.

CLEVER-1 представляет собой белок, описанный в WO 03/057130, общий рецептор-1 эндотелия лимфатической системы и эндотелия сосудов (Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor-1). Он представляет собой связывающий белок, опосредующий адгезию лимфоцитов к эндотелию как в системной, так и в лимфатической сосудистой сети. Посредством блокирования взаимодействия CLEVER-1 и его лимфоцитарного субстрата можно одновременно контролировать рециркуляцию лимфоцитов и миграцию лимфоцитов, и родственные состояния, такие как воспаление, в участке притока лимфоцитов в ткани и оттока из них. В WO 03/057130 дополнительно описано, что CLEVER-1 опосредует связывание других типов лейкоцитов, таких как моноциты и гранулоциты, с подобными HEV сосуда-ми. Таким образом, посредством блокирования взаимодействия CLEVER-1 и клеток злокачественной опухоли, становится возможным контролировать метастазирование посредством предотвращения захвата лимфатическими сосуда-ми злокачественных клеток, которые связываются с CLEVER 1, и таким образом, предотвращения распространения злокачественного новообразования в лимфатические узлы.

Обзор CLEVER-1, т.е. стабилина-1, приведен в Kzhyshkowska J. (2010), The ScientificWorld JOURNAL 10, 2039-2053. Супрессия Th1-лимфоцитов посредством CLEVER-1 недавно описана в Palani et al. (2016), Journal of Immunology 196: 115-123.

В WO 2010/122217 описан подтип макрофагов в опухолях, в плаценте и в крови беременных женщин. Этот подтип макрофагов определили как положительный по CLEVER-1 макрофаг и предположительно, как макрофаг типа 3. Посредством модуляции, т.е. противодействия или стимуляции, соответственно, по отношению к рецептору CLEVER-1 в этой клетке иммунной системы, можно влиять на индивидуума. Противодействие рецептору или его понижающая регуляция уменьшает размер злокачественной опухоли и/или рост злокачественной опухоли. Стимуляцию или повышающую регуляцию рецептора можно использовать для получения фетоматеринской толерантности и для предотвращения осложнений при беременности.

Механизмы для ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) также описаны в публикации Noy R. and Pollard J. W., "Tumour-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy", опубликовано в Immunity 41, July 17, 2014, p. 49-61. Макрофаги M2 преобладают в злокачественных опухолях человека и стимулируют рост опухолей, однако эти стимулирующие опухоль макрофаги можно перевести с помощью модуляции в ингибирующие рост опухоли макрофаги, называемые также макрофагами M1 или противовоспалительными макрофагами, с целью замедлить или остановить рост злокачественных опухолей. Однако, отмечено, что попытки лечения злокачественных опухолей с использованием доступных в настоящее время лекарственных средств, предназначенных для нацеливания на TAM, сопровождались нежелательными побочными эффектами, например, терапевтические способы с использованием макрофагов могут иметь системную токсичность или парадоксальным образом стимулировать рост опухолей, поскольку они нацелены на все макрофаги.

Особенно предпочтительные являющиеся антагонистами CLEVER-1 моноклональные антитела 3-266 (DSM ACC2519) и 3-372 (DSM ACC2520), оба депонированные по условиям Будапештского соглашения о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры 21 августа 2001 г., в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, описаны в WO 03/057130.

Цель и сущность изобретения

Одной из целей настоящего изобретения является предоставление средства, способного связываться со специфическим эпитопом CLEVER-1 человека. В частности, обнаружено, что средство, способное связываться со специфическим эпитопом CLEVER-1 человека, можно использовать для активации макрофагов для переключения их фенотипа из макрофагов M2 в макрофаги M1.

Кроме того, целью изобретения является предоставление гуманизированного антитела или гуманизированного одноцепочечного Fv, или фрагмента Fab для связывания с CLEVER-1 человека с увеличенной активностью связывания по сравнению с моноклональным антителом 3-372 (DSM ACC2520, депонированным в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 21 августа 2001 г.).

Таким образом, настоящее изобретение относится к средству, способному связываться с эпитопом CLEVER-1 человека, который не является непрерывным и содержит последовательности:

PFTVLVPSVSSFSSR (SEQ ID NO: 1) и

QEITVTFNQFTK (SEQ ID NO: 2).

В частности, настоящее изобретение относится к средству, способному связываться с CLEVER-1 человека, узнающему эпитоп CLEVER-1, который не является непрерывным и содержит последовательности:

PFTVLVPSVSSFSSR (SEQ ID NO: 1), и
 QEITVTFNQFTK (SEQ ID NO: 2),
 и средство содержит последовательности определяющих комплементарность областей (CDR), связывающихся с последовательностями указанного эпитопа, выбранные из группы, состоящей из
 TSGMGIG (SEQ ID NO: 7),
 HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 8),
 HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 9),
 TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 10),
 RTSNLAS (SEQ ID NO: 11) и
 HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 12).

В соответствии с изобретением средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, узнающее эпитоп CLEVER-1, определенный в настоящем изобретении, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела, одноцепочечного Fv или фрагмента(фрагментов) Fab, пептида(пептидов) или любой другой макромолекулы, имеющей соответствующую аффинность для связывания с указанным эпитопом.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству, способному связываться с CLEVER-1 человека у индивидуума, для использования для прекращения индуцированной опухолью или антигенном иммуносупрессии посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1, где средство связывается с эпитопом CLEVER-1 человека, который не является непрерывным и содержит последовательности:

PFTVLVPSVSSFSSR (SEQ ID NO: 1) и
 QEITVTFNQFTK (SEQ ID NO: 2).

Средство по изобретению, способное связываться с CLEVER-1 человека на ТАМ, предпочтительно, со специфическими последовательностями эпитопа на CLEVER-1, является пригодным для использования для лечения или предотвращения злокачественной опухоли посредством уменьшения размера злокачественной опухоли; посредством уменьшения роста злокачественной опухоли у индивидуума; и/или посредством ингибирования миграции злокачественных клеток и образования метастазов, где иммунную супрессию применительно к росту злокачественных новообразований прекращают посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

Средство по изобретению, способное связываться с CLEVER-1 человека, предпочтительно, со специфическими последовательностями эпитопа на CLEVER-1, является пригодным также для использования для лечения хронических инфекций у индивидуума, где супрессию иммунитета против инфекционных антигенов прекращают посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

Средство по изобретению, способное связываться с CLEVER-1 человека, предпочтительно со специфическими последовательностями эпитопа на CLEVER-1, является пригодным также для использования в качестве адъюванта вакцины, где супрессию иммунитета против антигенов вакцины прекращают посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу или одноцепочечному Fv, или фрагменту Fab, способному связываться с эпитопом CLEVER-1 человека, который не является непрерывным и содержит последовательности:

PFTVLVPSVSSFSSR (SEQ ID NO: 1) и
 QEITVTFNQFTK (SEQ ID NO: 2),

и указанное антитело или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab содержит:

а) константные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG4 человека, и
 б) одну или несколько из следующих последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR)

i) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 7), и/или
 CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 8), и/или
 CDR 3: HYGYPYAMDY (SEQ ID NO: 9); и

ii) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 10), и/или
 CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 11), и/или
 CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 12).

Другой целью настоящего изобретения является также предоставление фармацевтической композиции, содержащей средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, или гуманизированное антитело или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab по изобретению и пригодный наполнитель.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, или гуманизированное антитело или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab, как определено выше, и пригодный наполнитель, для использования для прекращения индуцированной опухолью или антигеном иммуносупрессии.

Фармацевтическая композиция по изобретению является пригодной для использования для лечения

или предотвращения злокачественной опухоли посредством уменьшения размера злокачественной опухоли; посредством уменьшения роста злокачественной опухоли у индивидуума; и/или посредством ингибирования миграции злокачественных клеток и образования метастазов. Фармацевтическая композиция по изобретению также является пригодной для использования для лечения хронических инфекций у индивидуума или для использования в качестве адъюванта вакцины.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А и 1В иллюстрируют представление в форме тепловой карты для результатов, полученных для антитела 3-266 и антитела AK FUMM 9-11.

Фиг. 2 иллюстрирует представление в форме тепловой карты для результатов, полученных для антитела FU-HI-3-372.

На фиг. 3 схематически проиллюстрирована доменная организация положений в CLEVER-1 идентифицированных связывающих мотивов.

Фиг. 4 иллюстрирует разделение в 1% агарозном геле продуктов RT-ПЦР для гибридомы 3-372.

Фиг. 5 иллюстрирует окрашенный Кумасси синим гель после SDS-PAGE очищенного с использованием белка А химерного IgG4 3-372.

Фиг. 6 иллюстрирует конкурентный ELISA CLEVER-1.

Фиг. 7 иллюстрирует схему вектора Antitope pANT.

Фиг. 8 иллюстрирует окрашенный Кумасси синим гель после SDS-PAGE избранных очищенных с использованием белка А антител.

Фиг. 9 иллюстрирует конкурентный ELISA CLEVER-1.

На фиг. 10А показаны результаты определения экспрессии HLA-DR на положительных по CD14 клетках, и на фигуре 10В показаны результаты для растворимого TNF-альфа, измеренного в культуральной среде с использованием набора для ELISA TNF-альфа (Invitrogen).

На фиг. 11А показана реполяризация TAM в сингенных карциномах молочной железы E0771 после введения антитела, связывающегося с CLEVER-1, и на фиг. 11В показана увеличенная секреция TNF-альфа на TAM из сингенной карциномы молочной железы E0771 после введения антитела, связывающегося с CLEVER-1.

На фиг. 12 проиллюстрировано, что связывание CLEVER-1 с антителами 9-11 и 3-372 симулирует противоположные эффекты на передачу сигналов mTOR и c-Jun в моноцитах периферической крови человека.

Подробное описание изобретения

Термины.

Термин "средство, способное связываться с эпитопом CLEVER-1 человека" относится к средствам, включающим антитела и их фрагменты, пептиды или т.п., которые являются способными связываться со специфическими последовательностями эпитопа, определенными в настоящем изобретении. Средство может также представлять собой любую макромолекулу, имеющую соответствующую аффинность для связывания с указанным эпитопом.

Термин "антитело или его фрагмент" используют в самом широком смысле для охвата антитела или его фрагмента, способных связываться с молекулой CLEVER-1 у индивидуума. В частности, его следует понимать как включающий химерные, гуманизированные или приматизированные антитела, так же как фрагменты антител и одноцепочечные антитела (например, Fab, Fv), при условии, что они обладают желательными видами биологической активности.

Термин гуманизированное антитело относится к любому антителу, в котором константные области не относящихся к человеку антител полностью заменены на человеческую форму константных областей, и по меньшей мере части переменных областей из не относящихся к человеку антител, исключая три петли из аминокислотных последовательностей снаружи каждой переменной области, которые связываются со структурой-мишенью, полностью или частично заменены на соответствующие части человеческих антител. Таким образом, в частности, любое антитело, названное по схеме наименований из международных непатентованных наименований (INN) Всемирной организации здравоохранения или наименований лекарств, официально присвоенных соответствующей организацией Соединенных Штатов (USAN), с частями основы -ксизу- или -зу-, в этом изобретении обозначено как гуманизированное антитело.

Термин переменный домен, обозначенный также как область Fv, является наиболее важной областью для связывания с антигенами. Чтобы обеспечивать специфичность, переменные петли из β -цепей, по три на каждой легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепи, являются ответственными за связывание с антигеном. Эти петли обозначены как определяющие комплементарность области (CDR).

Термин одноцепочечный фрагмент Fv или scFv относится к фрагментам, полученным посредством соединения доменов V_H и V_L посредством линкера в один полипептид. Термин гуманизированный одноцепочечный фрагмент Fv или scFv относится, по аналогии с определением термина гуманизированное антитело выше, к любому одноцепочечному фрагменту Fv или scFv, в котором константные области, происходящие не относящихся к человеку антител, полностью заменены на человеческую форму константных областей, и по меньшей мере части переменных областей, происходящих из не относящихся к

к человеку антител, исключая три петли из аминокислотных последовательностей снаружи каждой вариабельной области, которые связываются со структурой-мишенью, полностью или частично заменены на соответствующие части человеческих антител.

Термин фрагмент Fab относится к области антитела, которая связывается с антигенами. Термин гуманизированный фрагмент Fab относится, также по аналогии с определением термина гуманизированное антитело выше, к любому фрагменту Fab в котором константные области, происходящие не относящихся к человеку антител, полностью заменены на человеческую форму константных областей, и по меньшей мере части вариабельных областей, происходящих из не относящихся к человеку антител, исключая три петли из аминокислотных последовательностей снаружи каждой вариабельной области, которые связываются со структурой-мишенью, полностью или частично заменены на соответствующие части человеческих антител.

Термин "пептид" относится к любому пептиду, содержащему одну или несколько аминокислотных последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR), определенных в настоящем изобретении, и способному связываться по меньшей мере с одним эпитопом CLEVER-1 человека.

Предпочтительные варианты осуществления

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к средству, способному связываться с CLEVER-1 человека, узнающему эпитоп CLEVER-1, который не является непрерывным и содержит аминокислотные последовательности

PFTVLVPSVSSFSSR (SEQ ID NO: 1) и

QEITVTFNQFTK (SEQ ID NO: 2) из CLEVER-1 человека,

и указанное средство содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR), связывающихся с указанными последовательностями эпитопа, выбранными из группы, состоящей из

TSGMGIG (SEQ ID NO: 7),

HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 8),

HYGYDPYYAMDY (SEQ ID NO: 9),

TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 10),

RTSNLAS (SEQ ID NO: 11) и

HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 12).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения не являющийся непрерывным эпитоп CLEVER-1 человека дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

ATQTGRVFLQ (SEQ ID NO: 3),

DSL RDGRLIYLF (SEQ ID NO: 4),

SKGRILTMANQVL (SEQ ID NO: 5) и

LCVYQKPGQAFCTCR (SEQ ID NO: 6).

Часть белка-мишени CLEVER-1 человека, т.е. стабиллин-1 человека, определена в SEQ ID NO: 31. Эпитопы из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 на CLEVER-1 соответствуют аминокислотам 420-434, 473-484, 390-399, 576-587, 615-627 и 313-327 из белка-мишени CLEVER-1 человека, определенного в SEQ ID NO: 31.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения средство, способное связываться с эпитопом CLEVER-1 человека, содержит по меньшей мере две, предпочтительно три, более предпочтительно четыре, даже более предпочтительно пять и наиболее предпочтительно все шесть аминокислотных последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR), определенных выше.

В соответствии с настоящим изобретением, средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела, одноцепочечного Fv или фрагмента(фрагментов) Fab, пептида(пептидов) или макромолекулы(макромолекул).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, представляет собой гуманизированное антитело или одноцепочечный Fv или фрагмент Fab, и указанное антитело или гуманизированный одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab содержит

а) константные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG человека, и

б) одну или несколько из следующих последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR)

i) тяжелой цепи

CDR 1: TSGMGIG (SEQ ID NO: 7), и/или

CDR 2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 8), и/или

CDR 3: HYGYDPYYAMDY (SEQ ID NO: 9); и

ii) легкой цепи

CDR 1: TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 10), и/или

CDR 2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 11), и/или

CDR 3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 12).

Гуманизированное антитело или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab, способные связываться с эпитопом CLEVER-1 человека, узнают последовательности не являющегося непрерывным эпитопа, как определено выше. Не являющийся непрерывным эпитоп CLEVER-1 человека содержит по меньшей мере последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления не являющийся непрерывным эпитоп CLEVER-1 человека дополнительно содержит одну или несколько последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере две, предпочтительно, три, более предпочтительно, четыре, даже более предпочтительно, пять, и наиболее предпочтительно, все шесть CDR, определенные выше, содержатся в гуманизированном антителе или одноцепочечном Fv, или фрагменте Fab.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи IgG человека из гуманизированного антитела или одноцепочечного Fv, или фрагмента Fab выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20, предпочтительно, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи IgG человека из гуманизированного антитела или одноцепочечного Fv, или фрагмента Fab выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30, предпочтительно, SEQ ID NO: 30.

Во многих вариантах осуществления гуманизированного антитела или одноцепочечного Fv, или фрагмента Fab по изобретению константные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG человека являются следующими. Константные области IgG4 человека являются предпочтительными. Многие предпочтительные варианты осуществления содержат тяжелую цепь IgG4 человека и легкую цепь каппа IgG4 с мутациями L248E и/или, предпочтительно, и S241P.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab является способным связываться с CLEVER-1 человека с относительной IC50 < 1,0, предпочтительно, < 0,8, более предпочтительно, < 0,6 и наиболее предпочтительно, < 0,5, по сравнению с IC50 моноклонального антитела 3-372 (DSM ACC2520, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 21 августа 2001 г.).

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения комбинация вариабельных областей тяжелой и легкой цепи IgG человека выбрана из комбинаций, представленных в табл. 5, способных связываться с CLEVER-1 человека с относительной IC50 < 1,0, по сравнению с IC50 моноклонального антитела 3-372 (DSM ACC2520, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 21 августа 2001 г.).

Фармацевтическая композиция по изобретению содержит средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, или гуманизированное антитело, или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab, описанные выше, и пригодный наполнитель.

Перевод с помощью модуляции стимулирующих опухоль макрофагов (M2) в провоспалительные макрофаги (M1).

Обнаружено также, что средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, особенно, со специфическими последовательностями эпитопа на CLEVER-1, определенное в настоящем изобретении, можно использовать для активации макрофагов для переключения их фенотипа из макрофагов M2 в макрофаги M1. В частности, средство, способное связываться с CLEVER-1 на TAM, можно использовать для осуществления перевода с помощью модуляции стимулирующих опухоль макрофагов (M2) в провоспалительные макрофаги (M1). Эта модуляция увеличивает активацию Т-клеток и в конечном счете приводит, например, к прекращению происходящей из злокачественной опухоли иммуносупрессии. Более точно, обнаружено, что средство, способное связываться с конкретными последовательностями на молекуле CLEVER-1, можно использовать для прекращения иммуносупрессии посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1. Следовательно, настоящее открытие предоставляет способ для влияния на иммунную систему индивидуума и является особенно полезным для лечения злокачественной опухоли или предотвращения метастазирования, но без ограничения этим способом.

Макрофаги можно разделить на два отдельных фенотипа: макрофаги M1 и M2. Макрофаги M1 являются классическими провоспалительными макрофагами, которые продуцируют большие количества провоспалительных цитокинов и костимулирующих молекул, и являются очень эффективными для активации ответов Т-клеток. Макрофаги M2, напротив, представляют собой иммуносупрессирующие клетки, которые синтезируют противовоспалительные цитокины и индуцируют регуляторные Т-клетки и таким образом, сильно ослабляют управляемую антигеном активацию Т-клеток. Ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM) считают опасными, поскольку они созревают в макрофаги M2 (стимулирующие опухоль макрофаги) в окружении опухоли и супрессируют иммунный ответ против опухоли, и опосредуют ангиогенное переключение, критическую стадию в росте злокачественной опухоли. Макрофаги M2 можно переводить посредством модуляции в макрофаги M1 (провоспалительные макрофаги), и такое пре-

вращение фенотипа из M2 в M1 может напрямую или опосредованно вызывать отторжение опухоли.

В настоящем контексте выражение "макрофаги M1" или "провоспалительные макрофаги" относится к макрофагам, характеризующимся увеличенным измеренным уровнем секреции макрофагально-го/моноцитарного TNF-альфа (TNF- α) или экспрессии HLA-DR. Перевод с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1 может увеличивать секрецию моноцитарного TNF-альфа, а также экспрессию HLA-DR по сравнению с контрольными значениями, измеренными до введения средства, способного связываться с CLEVER-1 человека, или с значениями одного или нескольких предшествующих измерений, проведенных в другие временные точки у того же самого пациента. Важно сравнивать измеренные значения секреции моноцитарного TNF-альфа и экспрессии HLA-DR с значениями для того же самого пациента, поскольку уровень этих маркеров может меняться от индивидуума к индивидууму, и например, цитокины, такие как интерферон-гамма, и активация посредством LPS может увеличивать экспрессию TNF-альфа макрофагами M2.

Неожиданно обнаружено, что макрофаги M2 можно активировать для перевода с помощью модуляции в макрофаги M1 посредством приведения указанных макрофагов в контакт со средством, способным связываться с CLEVER-1 человека, например, антителом или его фрагментом, пептидом(пептидами) или макромолекулой(макромолекулами), как определено в настоящем изобретении. В частности, обнаружено, что макрофаги M2, ассоциированные с злокачественными опухолями, можно переводить посредством модуляции или реполяризации в макрофаги M1 посредством приведения указанных макрофагов в контакт со средством, способным связываться с CLEVER-1 человека на TAM. Оба фенотипа могут присутствовать в одно и то же время, и оба фенотипа можно обнаружить в опухолях.

Средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, такое как антиген или его фрагмент, пептид(ы) или макромолекула(макромолекулы), связывается с CLEVER-1 человека для достижения такой модуляции или реполяризации фенотипов макрофагов. Идентифицировано, что средства, специфические для белка CLEVER-1, узнают специфические последовательности эпитопа CLEVER-1, определенные в настоящем изобретении.

Специфическое связывание с двумя или более указанными последовательностями эпитопа на CLEVER-1 на TAM может обеспечивать новый способ лечения злокачественных опухолей или предотвращения метастазирования без опасных побочных эффектов, поскольку лечение можно нацеливать на специфические эпитопы для достижения желательной модуляции фенотипа макрофагов. Следовательно, открытия, описанные в настоящем описании, являются особенно полезными для лечения или предотвращения всех видов злокачественных опухолей, ассоциированных с увеличенным количеством стимулирующих опухоль макрофагов или других патологий, таких как хроническое воспаление, когда у индивидуума присутствует доминирование иммуносупрессии. Следовательно, способ лечения злокачественной опухоли или предотвращения метастазирования включает введение индивидууму средства, способного связываться с CLEVER-1 человека, предпочтительно, со специфическими эпитопами на молекуле CLEVER-1, определенными выше. Способ включает лечение или предотвращение злокачественной опухоли посредством уменьшения размера злокачественной опухоли и/или; посредством уменьшения роста злокачественной опухоли у индивидуума; и/или посредством ингибирования миграции злокачественных клеток и образования метастазов. Таким образом, можно лечить доброкачественную или злокачественную опухоль или метастазирование злокачественной опухоли, такой как рак кожи и рак толстого кишечника. Можно лечить также лейкозы, лимфомы и множественные миеломы. В частности, ожидают, что меланомы и лимфомы будут очень хорошо отвечать на лечение, на основании моделей на животных.

Макрофаги играют также важную роль в ходе разрешения воспаления и инфекции, помимо влияния на рост или регрессию опухолей. При инфекциях может происходить переключение от макрофагов M1 до M2, приводящее к образованию супрессивного окружения, подавляющего эффекторный иммунитет. Следовательно, открытия, описанные в настоящем описании для модуляции фенотипа макрофагов, можно использовать в лечении хронических инфекций для прекращения супрессии иммунитета против инфекционных антигенов. Изобретение относится также к способу лечения хронических инфекций, включающему введение индивидууму средства, способного связываться с CLEVER-1, предпочтительно, с двумя или более специфическими последовательностями эпитопа на молекуле CLEVER-1, определенными в настоящем изобретении, где указанное средство может активировать макрофаги для переключения их фенотипа из M2 в M1.

Кроме того, средство, способное связываться с молекулой CLEVER-1 на макрофагах и моноцитах у индивидуума, можно использовать в качестве адъюванта в вакцинах. Указанное средство обеспечивает реполяризацию макрофагов и таким образом, прекращает или по меньшей мере уменьшает супрессию иммунитета против антигенов вакцины. Любая индуцированная антигеном вакцинация может обеспечивать преимущество, если из хозяина или участка вакцинации можно временно удалять иммуносупрессивные элементы.

Перевод посредством модуляции макрофагов M2 в M1 можно проверять посредством измерения секреции моноцитарного TNF-альфа из образцов крови человека. Следовательно, увеличенную секрецию TNF-альфа можно использовать в качестве маркера для мониторирования ответа индивидуума на лечение. Секрецию TNF-альфа можно определять в моноцитах периферической крови, обогащенных из кро-

ви, отобранной у пациента. Измеренный уровень TNF-альфа можно использовать в качестве маркера для ответа пациента на лечение, включающее введение средства, способного связываться с CLEVER-1 у пациента, где уровень сравнивают с контрольным уровнем, измеренным у пациента до введения указанного средства пациенту, или с значениями одного или нескольких предшествующих измерений, проведенных в различные временные точки у того же самого пациента.

Способ определения эффективности терапии против CLEVER-1 посредством мониторингирования развития перехода посредством модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1, когда вводят средство, способное связываться с CLEVER-1, предпочтительно, с указанными одной, двумя или более специфическими последовательностями эпитопа на CLEVER-1, у пациента, включающий стадии:

(a) получения моноцитов периферической крови (PBL) из образца крови, отобранного у указанного пациента,

(b) измерения секреции TNF- α указанными PBL, и/или

(c) измерения экспрессии HLA-DR на положительных по CD14 PBL, и

(e) сравнения уровней секреции TNF- α и/или экспрессии HLA-DR, измеренных на стадиях (b) и (c), с контрольными значениями для определения эффективности лечения против CLEVER-1, где контрольные значения представляют собой значения, измеренные до введения средства, способного связываться с CLEVER-1, у пациента, или значения одного или нескольких предшествующих измерений, проведенных в различные временные точки у того же самого пациента, и где увеличенная секреция TNF-альфа или экспрессия HLA-DR является показателем перевода посредством модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

Определение секреции TNF-альфа из моноцитов периферической крови, полученных из образца крови, отобранного у пациента, можно проводить общеизвестными способами, например, с использованием коммерческого набора для ELISA TNF-альфа. Экспрессию HLA-DR на положительных по CD14 моноцитах можно также мониторировать с использованием известного способа проточной цитометрии.

Развитие перевода посредством модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1 можно мониторировать посредством сравнения уровня секреции моноцитарного TNF-альфа с контрольными значениями, измеренными до введения средства, способного связываться с CLEVER-1, у пациента, или со значениями одного или нескольких предшествующих измерений, проведенных в другие временные точки у того же самого пациента. Например, уменьшение уровня секреции моноцитарного TNF-альфа по сравнению с результатами предшествующих измерений или с контролем можно использовать в качестве показателя более высокой экспрессии белков макрофагов M2, в то время как увеличение уровня TNF-альфа, по сравнению с результатами предшествующих измерений или с контролем можно использовать в качестве показателя более высокой экспрессии белков макрофагов M1 с более низкой экспрессией белков макрофагов M2, где это также можно использовать в качестве показателя эффективности лечения против CLEVER-1. Увеличенный уровень TNF-альфа указывает на более высокую экспрессию белков макрофагов M1 с более низкой экспрессией белков макрофагов M2, т.е. это можно приписать способности отвечать на указанную терапию. Средство, способное связываться с CLEVER-1, может активировать по меньшей мере часть макрофагов M2 для реполяризации в макрофаги M1, и после введения указанного средства могут присутствовать оба фенотипа макрофагов, но можно наблюдать увеличение экспрессии белков макрофагов M1 по сравнению с ситуацией до введения указанного средства. Как правило, по меньшей мере двукратное увеличение измеренной секреции TNF-альфа по сравнению с контрольным значением является показателем перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1 и таким образом, является показателем способности пациента отвечать на терапию.

Заболевания, отвечающие на лечение.

Уравновешивание иммунной активации и супрессии является очень критичным для гомеостаза человека (или животного) в борьбе против чужеродного материала, образованного в организме человека (или животного) или проникшего в организм человека (или животного). Пример из Palani et al. (2016) представляет собой физиологический пример этого и показывает, что местная иммуносупрессия является критической для благополучия эмбриона в окружении с доминирующей иммунной защитой матери. То же самое может иметь место при хронических инфекциях, поскольку некоторые патогены (например, при туберкулезе) научились использовать сходный механизм укрытия от иммунной системы хозяина и могут образовывать участки хронической инфекции (при гепатите). Удаление этой местной иммуносупрессии может помочь хозяину бороться с этими инфекциями, так же как это может улучшать вакцинацию против этих устойчивых патогенов.

Опухоли также адаптировали эту иммуносупрессию для своего преимущества. Способ в соответствии с настоящим изобретением для лечения или предотвращения злокачественной опухоли посредством уменьшения размера злокачественной опухоли; посредством уменьшения роста злокачественной опухоли; и/или посредством ингибирования миграции злокачественных клеток и образования метастазов является применимым ко всем формам злокачественных опухолей. Таким образом, можно лечить доброкачественную или злокачественную опухоль или метастазирование злокачественной опухоли, такой как рак кожи и рак толстого кишечника. Также можно лечить лейкозы, лимфомы и множественные миеломы. В

частности, ожидают, что меланомы и лимфомы могут очень хорошо отвечать на лечение, на основании моделей на животных.

Авторы настоящего изобретения считают, что средство, способное связываться с CLEVER-1, или гуманизированное антитело, или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением являются полезными для лечения или предотвращения всех видов сарком, например, фибросаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеосаркомы, ангиосаркомы, лимфангиосаркомы, лейомиосаркомы и рабдомиосаркомы, мезотелиомы, менингиомы, лейкозов, лимфом, так же как всех видов карцином, таких как плоскоклеточный рак, базально-клеточная карцинома, аденокарциномы, папиллярные карциномы, цистаденокарциномы, бронхогенные карциномы, меланомы, виды почечноклеточного рака, печеночноклеточная карцинома, переходноклеточные карциномы, хориокарциномы, семиномы и эмбриональные карциномы.

Средство, способное связываться с CLEVER-1 человека у индивидуума, или гуманизированное антитело, или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab, или фармацевтическая композиция по изобретению являются пригодными для использования для прекращения индуцированной опухолью или антигеном иммуносупрессии посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1, где средство связывается с последовательностями эпитопа CLEVER-1 человека, определенными в настоящем изобретении.

Средство, способное связываться с CLEVER-1 человека у индивидуума, или гуманизированное антитело, или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab, или фармацевтическая композиция по изобретению являются пригодными для использования для лечения или предотвращения злокачественной опухоли посредством уменьшения размера злокачественной опухоли; посредством уменьшения роста злокачественной опухоли у индивидуума; и/или посредством ингибирования миграции злокачественных клеток и образования метастазов, где иммуносупрессию в области роста злокачественной опухоли прекращают посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

Средство, способное связываться с CLEVER-1 человека у индивидуума, или гуманизированное антитело, или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab, или фармацевтическая композиция по изобретению, также являются пригодными для использования в лечении хронической инфекции у индивидуума, где супрессию иммунитета против инфекционных антигенов прекращают посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

Средство, способное связываться с CLEVER-1 человека у индивидуума, или гуманизированное антитело, или одноцепочечный Fv, или фрагмент Fab или фармацевтическая композиция по изобретению также являются пригодными для использования в качестве адъюванта вакцины, где супрессию иммунитета против антигенов вакцины прекращают посредством перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1.

Способ перевода с помощью модуляции макрофагов M2 в макрофаги M1 включает введение нуждающемуся в этом субъекту средства, способного связываться с CLEVER-1, предпочтительно, способного связываться со специфическими последовательностями на молекуле CLEVER-1, как определено в настоящем изобретении. Указанный способ можно использовать в лечении злокачественной опухоли или в предотвращении метастазирования у индивидуума, или в лечении хронических инфекций у индивидуума. Ответ на лечение можно проверять посредством измерения секреции TNF- α из указанных PBL и/или экспрессии HLA-DR на положительных по CD14 PBL, как описано в настоящем изобретении.

Способы введения, составы и необходимая доза

Фармацевтические композиции для использования по настоящему изобретению можно вводить любыми способами, приводящими к достижению предназначенной для них цели. Например, введение может представлять собой внутривенное, внутрисуставное введение, введение внутрь опухоли или подкожное введение. В дополнение к фармакологически активным соединениям, фармацевтические препараты соединений, предпочтительно, содержат пригодные фармацевтически приемлемые носители, содержащие наполнители и вспомогательные средства, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике.

Выбранная доза должна быть терапевтически эффективной применительно к подвергаемому лечению заболеванию.

Соответственно, иммуносупрессия должна быть достаточной для лечения заболевания без эффектов, представляющих существенную угрозу для желательного исхода лечения. Во время лечения или предотвращения злокачественной опухоли доза должна являться достаточной для уменьшения размера злокачественной опухоли, уменьшения роста злокачественной опухоли и/или ингибирования миграции злокачественных клеток и образования метастазов. Доза является зависимой от оборачиваемости введенного средства, как правило, эти обработки следуют режиму 1-5 мг/кг через каждые 2-4 недели.

Примеры

Следующий экспериментальный раздел иллюстрирует изобретение посредством предоставления примеров.

Примеры 1-9 иллюстрируют картирование не являющегося непрерывным эпитопа CLEVER-1 человека и получение гуманизированных антител из мышинового моноклонального антитела 3-372 (DSM ACC2520, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 21 августа 2001 г.) с использованием технологии составного человеческого антитела Composite Human Antibody™. Способность антител против CLEVER-1 стимулировать иммунную активацию проиллюстрирована в примерах 10-13.

Пример 1 иллюстрирует полное картирование не являющегося непрерывным эпитопа для антител, нацеленных на CLEVER-1 человека.

Примеры 2-5 иллюстрируют определение последовательностей области V тяжелой и легкой цепи (V_H и V_L) клона 3-372 антитела против Clever 1 и продукцию химерных антител, содержащих переменные области 3-372 и константные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG4 человека. мРНК выделяли из клона гибридомы 3-372, подвергали обратной транскрипции, амплифицировали посредством ПЦР и клонировали специфические для антитела транскрипты. Определяли нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела, и проводили анализ данных о последовательности для гуманизации с использованием патентованной технологии составного человеческого антитела Composite Human Antibody™ от Antitope.

Примеры 2-5 показывают, что переменные области из мышинового антитела 3-372 против Clever 1 клонировали и секвенировали. Гены переменных областей комбинировали с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG4(S241P) человека и экспрессировали в клетках NS0 для получения химерного антитела против Clever 1. Конкурентный анализ ELISA полученного из NS0 химерного антитела использовали, чтобы показать, что эффективность связывания химерного антитела против Clever-1 является сходной с эффективностью исходного мышинового антитела.

Примеры 6-9 иллюстрируют: дизайн составных человеческих антител Composite Human Antibodies™ против CLEVER-1, которые экспрессировали и тестировали по связыванию с Clever-1 человека. Ключевые остатки, вовлеченные в структуру и связывание антител против CLEVER-1, определяли по моделированию структуры и гомологии для получения "карты ограничения по остаткам". Карту ограничения по остаткам использовали в качестве матрицы для фрагментов-источников последовательности человеческой области V из баз данных, содержащих неродственные последовательности человеческих антител. Каждый отобранный фрагмент последовательности, так же как стыки между фрагментами, тестировали по присутствию потенциальных Т-клеточных эпитопов с использованием анализа *in silico* (iTope™ и TCED™). С использованием этого способа, все варианты последовательности составного человеческого антитела Composite Human Antibody™ разрабатывали, чтобы избежать Т-клеточных эпитопов. Гены областей V составного человеческого антитела Composite Human Antibody™ получали с использованием синтетических олигонуклеотидов, кодирующих комбинации отобранных фрагментов человеческой последовательности. Затем их клонировали в векторы, содержащие константные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG4(S241P) человека, и антитела получали и тестировали по связыванию с антигеном-мишенью посредством конкурентного ELISA по сравнению с исходным эталонным мышинным моноклональным антителом.

Примеры 6-9 показывают конструирование областей V четырех V_H и пяти V_L составного человеческого антитела Composite Human Antibody™. Комбинации составных тяжелых и легких цепей экспрессировали в клетках NS0, очищали и тестировали по связыванию с CLEVER-1 в конкурентном анализе ELISA. Результаты показали, что эффективность связывания многих из составных человеческих антител Composite Human Antibodies™ с CLEVER-1 являлась по меньшей мере настолько хорошей, как эффективность химерного эталонного антитела, и эффективность нескольких была заметно лучше. На основании отсутствия потенциального участка гликозилирования и неспаренного цистеина, и полученных наборов данных экспрессии и эффективности связывания, три потенциальных лидирующих кандидата обозначены следующим образом: $VH2/VK5$, $VH3/VK5$ и $VH4/VK5$.

Примеры 10-11 иллюстрируют связывание антитела против CLEVER-1 на моноцитах периферической крови человека и активацию секреции TNF-альфа моноцитами периферической крови человека.

Пример 12 иллюстрирует механизм действия антител против CLEVER-1 на ассоциированные с опухолью макрофаги в моделях сингенных злокачественных опухолей на мышах.

Пример 13 иллюстрирует, что связывание CLEVER-1 с антителами 9-11 и 3-372 стимулирует противоположные эффекты на передачу сигналов mTOR и c-Jun в моноцитах периферической крови человека.

Пример 1.

Полное картирование не являющегося непрерывным эпитопа CLEVER-1 человека.

Предварительные не являющиеся непрерывными эпитопы для четырех антител определяли с использованием анализа Pepscan. Антитела FAR02 $VH3/VK5$ и FU-HI-3-372 нацелены на один и тот же не

являющийся непрерывным эпитоп, в то время как антитела 3-266 и АК FUMM 9-11 нацелены на другие отдельные эпитопы.

Исследование проводили в Pepscan Presto BV (Zuidersluisweg 2, 8243RC Lelystad, The Netherlands).

Антитела 3-266, FAR02 VH3/VK5, FU-HI-3-372 и АК FUMM 9-11 предоставлены Faron Pharmaceuticals Oy.

Белок-мишень CLEVER-1 человека, т.е. стабиллин-1 человека, определен в SEQ ID NO: 31. Дисульфидные мостики соединяют остатки (нумерация Uniprot STAB1 HUMAN):

112	126		120	136		138	147		160	171		164	181		183	192
199	210		204	217		236	247		241	257		259	270		732	746
740	756		758	767		822	837		831	846		865	879		873	889
891	902		908	922		916	932		934	945		951	964		958	974

Технология CLIPS.

В технологии CLIPS используют структурно фиксированные пептиды в определенных трехмерных структурах. Это приводит в результате к функциональным миметикам даже наиболее сложных участков связывания. Технология CLIPS в настоящее время является общеупотребительной для придания пептидным библиотекам формы структур одиночных, двойных или тройных петель, так же как подобных листу и спирали сворачиваний. Реакция CLIPS происходит между группами брома остова CLIPS и тиоловыми боковыми цепями остатков цистеина. Реакция является быстрой и специфической в мягких условиях. С использованием этой простой химической реакции, нативные белковые последовательности трансформируют в конструкции CLIPS с диапазоном структур. (Timmerman et al., J. Mol. Recognit. 2007; 20: 283-29)

Скрининг библиотеки CLIPS начинают с перевода белка-мишени в библиотеку из вплоть до 10000 перекрывающихся пептидных конструкций, с использованием дизайна комбинаторной матрицы. На твердом носителе синтезируют матрицу линейных пептидов, которым затем придают форму пространственно определенных конструкций CLIPS. Конструкции, представляющие обе части не являющегося непрерывным эпитопа в правильной конформации, связывают антитело с высокой аффинностью, которую детектируют и количественно оценивают. Конструкции, представляющие неполный эпитоп, связывают антитело с более низкой аффинностью, в то время как конструкции, не содержащие эпитоп, вообще не связываются.

Информацию об аффинности используют в циклических скринингах для подробного определения последовательностей и конформации эпитопов. Белок-мишень, содержащий не являющийся непрерывным конформационный эпитоп, переводят в библиотеку матриц. Комбинаторные пептиды синтезируют на патентованной миникарте и химически переводят в пространственно определенные конструкции CLIPS.

Анализ тепловой карты.

Тепловая карта представляет собой графическое представление данных, где значения, полученные посредством переменных, на двумерной карте представлены в виде цветов.

Для пептидов CLIPS с двумя петлями, такую двумерную карту можно выводить из независимых последовательностей первых и вторых петель. Например, последовательности 16 пептидов CLIPS фактически представляют собой перетасовку, например, 4 уникальных подпоследовательностей, например, в петле 1, и например, 4 уникальных подпоследовательностей, например, в петле 2. Таким образом, наблюдаемые данные ELISA можно наносить на график в матрице 4x4, где каждая координата X соответствует последовательности первой петли, и каждая координата Y соответствует последовательности второй петли.

Для дополнительного облегчения визуализации, значения в ELISA можно заменять цветовой формой из непрерывного градиента. Например, необычайно низкие значения можно окрашивать зеленым, необычайно высокие значения окрашивают красным, и средние значения окрашивают черным.

Синтез пептидов.

Для реконструкции эпитопов молекулы-мишени, синтезировали библиотеку пептидов. Функционализированную по аминокислотам полипропиленовую подложку получали посредством прививки патентованного состава гидрофильного полимера, с последующей реакцией с т-бутилоксикарбонилгексаметилендиамин (BocHMDA) с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC) с N-гидроксисбензотриазолом (HOBt) и последующим отщеплением Boc-групп с использованием трифторуксусной кислоты (TFA).

Стандартный Fmoc-пептидный синтез использовали для синтеза пептидов на аминокислотифункционированной твердой подложке посредством модифицированных по заказу станций транспортировки жидкостей JANUS (Perkin Elmer).

Синтез структурных миметиков выполняли с использованием запатентованной Pepscan технологии химически связанных пептидов на остовах (Chemically Linked Peptides on Scaffolds, CLIPS). Технология CLIPS позволяет придание пептидам структуры одиночных петель, двойных петель, тройных петель, подобных листу складок, подобных спирали сворачиваний и их комбинаций. К матрицам CLIPS присое-

диняют остатки цистеина. Боковые цепи многочисленных остатков цистеина в пептидах присоединяют к одной или двум матрицам CLIPS. Например, 0,5 мМ раствор P2 CLIPS (2,6-бис(бромметил)пиридина) растворяют в бикарбонате аммония (20 мМ, pH 7,8)/ацетонитриле (1:3 (об./об.)). Этот раствор добавляют к массивам пептидов. Матрица CLIPS может связываться с боковыми цепями двух остатков цистеина, которые присутствуют в связанных с твердой фазой пептидах из массивов пептидов (455-луночный планшет с 3 мкл лунками). Массивы пептидов осторожно встряхивают в растворе в течение 30-60 мин, полностью покрытые раствором. Наконец, массивы пептидов интенсивно промывают избытком H₂O и обрабатывают ультразвуком в буфере для разрушения, содержащем 1% SDS/0,1% бета-меркаптоэтанол в PBS (pH 7,2) при 70°C в течение 30 мин, с последующей обработкой ультразвуком в H₂O в течение следующих 45 мин. Несущие T3 CLIPS пептиды получали сходным образом, но теперь с тремя остатками цистеина.

Скрининг посредством ELISA.

Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов тестировали в ELISA на основе PEP-SCAN. Массивы пептидов инкубировали с раствором первичного антитела (в течение ночи при 4°C). После промывки, массивы пептидов инкубировали с разведением 1/1000 соответствующего конъюгата антитела с пероксидазой (SBA; табл. 1) в течение одного часа при 25°C. После промывки, добавляли субстрат пероксидазы 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3-процентной H₂O₂.

Через один час, измеряли проявление окрашивания. Проявление окрашивания оценивали количественно с использованием камеры на основе приборов с зарядовой связью (CCD) и системы обработки изображений.

Таблица 1

Детали антител

Наименование	Поставщик	Кат. No
Конъюгат с HRP антитела козы против антител человека	Southern Biotech	2010-05
Конъюгат с HRP антитела кролика против IgG (J+L) мыши	Southern Biotech	6175-05
Конъюгат с HRP антитела козы против IgM+IgG (H+L) крысы	Southern Biotech	3010-05

Langedijk et al. (2011). Helical peptide arrays for lead identification and interaction site mapping, *Analytical Biochemistry* 417: 149-155.

Дизайн пептидов.

Различные группы пептидов синтезировали в соответствии со следующим дизайном. Следует отметить, что в некоторых группах пептиды синтезировали в случайном порядке. Ниже показан фактический порядок пептидов.

Группа 1

Тип миметика	линейный
Метка	LIN
Описание	Линейные 15-членные пептиды, выведенные из последовательности-мишени из Clever-1 человека со смещением на один остаток.
Последовательности	(первые 10) QVLFKGC DVKTTFVT VLFKGC DVKTTFVTH LFKGC DVKTTFVTHV FKGC DVKTTFVTHVP KGC DVKTTFVTHVPC GCDVKTTFVTHVPCT CDVKTTFVTHVPCTS DVKTTFVTHVPCTSC

	VKTTFVTHVPCTSCA KTTFVTHVPCTSCAA
<u>Группа 2</u>	
Тип миметика	линейный
Метка	LIN.AA
Описание	Пептиды из группы 1, но с остатками в положениях 10 и 11, замененными на Ala. Если нативный Ala встречается в каком-либо положении, его заменяют на Gly.
Последовательности	(первые 10) GAETPCNGHAACLDG LTMANQVLAASISEE ILLPPTILPAAPKHC DRNGTCVCQAAFRGS PGYTQQGSEAAAPNP PIDPCRAGNAACHGL HTDALCSYVAAGQSR KGCDEVKTTFAAHVPC CQALNTSTCAANSVK RAVGGGQRVAACPPG
<u>Группа 3</u>	
Тип миметика	линейный
Метка	LIN20.C
Описание	Линейные пептиды длиной 20, выведенные из последовательности-мишени из Clever-1 человека со смещением на один остаток. Остатки Cys защищены ацетимидометиллом (Асм, обозначены «2»).
Последовательности	(первые 10) 2H2PENYHGDGMV2LPKDP2 SGWLRELPDQITQD2RYEVQ LAQH2HLHAR2VSQEGVAR2 IKKQT2PSGWLRELPDQITQ

	2RESEVGDGRA2YGHLLHEV QRV2T2PPGFGDGS2YGD NGVFHVVTGLRWQAPSGTPG AT2QVTADGKTS2V2RESEV KYSYKYKDQPQQTFNIIKAN 2VYIHDPTGLNVLKKG2ASY
<u>Группа 4</u>	
Тип миметика	линейный
Метка	LIN25.C
Описание	Линейные пептиды длиной 25, выведенные из последовательности-мишени из Clever-1 человека со смещением на один остаток. Остатки Cys защищены Acm («2»).
Последовательности	(первые 10) KKG2ASY2NQTIMEQG22KGFFGPD PD2QSV2S2VHGV2NHGPRGDGS2L GPGQSR2T2KLGFAGDGYQ2SPIDP IFPKE2VYIHDPTGLNVLKKG2ASY PTILPILPKH2SEEQHKIVAGS2VD ENFRGSA2QE2QDPNRFQPD2QSV2 QNTQ2SAEAPS2R2LPGYTQQGSE2 GRV2VAIDE2ELDMRGG2HTDAL2S APSGTQDPKRTIGQILASTEAFSR DGMV2LPKDP2TDNLGG2PSNSTL2
<u>Группа 5</u>	
Тип миметика	Ограничивающие пептиды, mP2 CLIPS
Метка	LOOP
Описание	Пептиды длиной 17. В положениях 2-16 представляют собой 15-членные последовательности, выведенные из белка-мишени. В положениях 1 и 17 находятся остатки Cys, соединенные посредством mP2 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены Acm («2»).

Последовательности	(первые 10) CL2SYVGPQSR2T2KC C2SYVGPQSR2T2KLC CSYVGPQSR2T2KLGC CYVGPQSR2T2KLGFC CVGPQSR2T2KLGFAC CGPGQSR2T2KLGFAGC CPGQSR2T2KLGFAGDC CGQSR2T2KLGFAGDGC CQSR2T2KLGFAGDGYC CSR2T2KLGFAGDGYQC
<u>Группа 6</u>	
Тип миметика	Линейные дисульфидные миметики
Метка	CYS22
Описание	Линейные дисульфидные миметики длиной 22, разработанные на основании информации Uniprot по дисульфидным мостикам для CLEVER-1 человека. Остатки Cys внутри миметика, которые не участвуют в формировании дисульфидных мостиков, защищены Асм («2»).
Последовательности	(первые 10) WGSR2HECPGGAETP2NGHGT SR2HECPGGAETP2NGHGTCLD 2HECPGGAETP2NGHGTCLDGM ECPGGAETP2NGHGTCLDGM GAETPCNGHGT2LDGMDRNGTC ETPCNGHGT2LDGMDRNGTCV2 PCNGHGT2LDGMDRNGTCV2QE LDGMDRNGT2VCQENFRGSACQ GMDRNGT2VCQENFRGSACQE2 DRNGT2VCQENFRGSACQE2QD
<u>Группа 7</u>	
Тип миметика	Комбинаторные миметики с

Метка	дисульфидными мостиками CYS27
Описание	Комбинаторные пептиды длиной 27. В положениях 1-11 и 16-27 представляют собой 11-мерные последовательности, выведенные из последовательности-мишени на странице 7, соединенные линкером «GGSGG». Эту группу пептидов разрабатывали на основании информации о дисульфидных мостиках, полученной из Uniprot. Остатки Cys внутри миметика, которые не участвуют в формировании дисульфидных мостиков, защищены Asn («2»).
Последовательности	(первые 10) PGYWGSR2HECGSGGAETP2NGHGTC YWGSR2HECGSGGSGGAETP2NGHIGTC GSR2HECGGAGGSGGAETP2NGHGTC R2HECGGAETGGSGGAETP2NGHGTC HECGGAETP2GGSGGAETP2NGHGTC CPGGAETP2NGGSGGAETP2NGHGTC PGYWGSR2HECGSGGTP2NGHGTCLD YWGSR2HECGSGGTP2NGHGTCLD GSR2HECGGAGSGGTP2NGHGTCLD R2HECGGAETGGSGGTP2NGHGTCLD
<u>Группа 8</u>	
Тип миметика	Не являющаяся непрерывной матрица, T3 CLIPS
Метка	МАТ
Описание	Пептиды длиной 33. В положениях 2-16 и 18-32 находятся 15-мерные пептиды, выведенные из последовательности-мишени из Clever-1 человека. В положениях 1, 17 и 33 находятся остатки Cys, соединенные посредством T3 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены Asn («2»).
Последовательности	(первые 10) CPNRFPGPD2QSV2S2VCV2S2VHGV2NHGPRGC CHGDGMV2LPKDP2TDCSAG2FAF2SPFS2DRC C2VD2QALNTST2PPNCPKH2SEEQHKIVAGSC CPKH2SEEQHKIVAGSCGPD2TQ2PGGFSPNP2C CRYEVQLGGSMVSMGCV2TS2AAIKKQT2PC CHKIVAGS2VD2QALNCIHMLDGILLPPTILPC CF2T2RPGLVSINSNACVTADGKTS2V2RESEC C2VYIHDPTGLNVLKKCGSGGV2QQGT2APGFC CLRVAVAMMDQG2REICDGRA2YGHLLHEVQKC CYSYKYKDQPQQTFNICHEVQKATQTGRVFLQC

Детали скрининга.

Связывание антитела зависит от комбинации факторов, включая концентрацию антитела и количество и природу конкурирующих белков в буфере для ELISA. А также, условия предварительного покрытия (специфической обработки массивов пептидов перед инкубацией с экспериментальным образцом) влияют на связывание. Эти детали обобщены в табл. 2. Для буфера Perscan и предварительной обработки (SQ), числа показывают относительное количество конкурирующего белка (комбинации лошадиной сыворотки и овальбумина).

Таблица 2

Условия скрининга			
Метка	Разведение	Буфер образцов	Предварительная обработка
3-266	5 мкг/мл	10%SQ	10%SQ
AK FUMM 9-11	1 мкг/мл	50%SQ	50%SQ
FAR02 VH3/VK5	3 мкг/мл	1%SQ	1%SQ
FU-HI_3-372	5 мкг/мл	1%SQ	1%SQ

Результаты.

Антитело 3-266.

При тестировании в условиях высокой строгости антитело 3-266 не связывало никаких пептидов, присутствующих в массивах. При тестировании в условиях низкой строгости антитело связывало все пептиды из всех групп. Результаты, полученные с использованием миметиков простых эпитопов, позволяют предполагать, что последовательность ¹⁰³⁰QWLKSAGITLPADRR¹⁰⁴⁴ представляет доминантную часть эпитопа. Данные, полученные с использованием миметиков комбинаторных эпитопов (фиг. 1), позволяют предполагать, что антитело, кроме того, узнает последовательность ⁸⁵⁷LHARCVSQEGVARCR⁸⁷¹. Более того, слабый и стабильный сигнал регистрировали для пептидов с последовательностью ⁴³⁵TMNASLAQQLCRQHI⁴⁵⁰. Фиг. 1А иллюстрирует представление в форме тепловой карты для результатов, полученных для антитела 3-266 в группе 8 (миметиков не являющегося непрерывным эпитопом). Средний сигнал нанесен на график черным цветом, и чрезвычайно высокий сигнал нанесен на график светлым. Обведенные рамкой области увеличены.

Антитело AK FUMM 9-11.

При тестировании в условиях высокой строгости антитело AK-FUMM 9-11 связывало пептиды из всех групп. Результаты, полученные с использованием миметиков простых эпитопов, позволяют предполагать, что антитело узнает ⁸⁸⁵PSNPCSHPDGRG⁸⁹⁶, представляющий доминантную часть эпитопа. Данные, полученные с использованием миметиков комбинаторных эпитопов, позволяют предполагать, что антитело, кроме того, узнает последовательность ¹⁶⁶FRGSACQECQDPNRF¹⁸⁰ (фиг. 1В). Фиг. 1В иллюстрирует представление в форме тепловой карты для результатов, полученных для антитела AK FUMM 9-11 в группе 8 (миметиков не являющегося непрерывным эпитопом). Средний сигнал нанесен на график черным цветом, и чрезвычайно высокий сигнал нанесен на график светлым. Обведенные рамкой области увеличены.

Антитело FAR02 VH3/VK5 и FU-HI:3-372.

При тестировании в условиях высокой строгости антитела FAR02 VH3/vk5 и FU-HI-3-372 не связывали никаких пептидов, присутствующих в массивах. При тестировании в условиях низкой строгости эти антитела специфически связывали пептиды только из группы 8 (фиг. 2). Анализ результатов, полученных с использованием не являющихся непрерывными миметиков, позволяют предполагать, что антитело узнает не являющийся непрерывным эпитоп, состоящий из последовательностей ³⁹⁰ATQTGRVFLQ³⁹⁹ (SEQ ID NO: 3), ⁴²⁰PFTVLVPSVSSFSSR⁴³⁴ (SEQ ID NO: 1), ⁴⁷³QEITVTFNQFTK⁴⁸⁴ (SEQ ID NO: 2), ⁵⁷⁶DSL RDGRLIYLF⁵⁸⁷ (SEQ ID NO: 4), ⁶¹⁵SKGRILTMANQVL⁶²⁷ (SEQ ID NO: 5), где последовательности ⁴⁷³QEITVTFNQFTK⁴⁸⁴ (SEQ ID NO: 2) и ⁴²⁰PFTVLVPSVSSFSSR⁴³⁴ (SEQ ID NO: 1), по-видимому, представляют коровые эпитопы. Дополнительный более слабый сигнал регистрировали для не являющихся непрерывными миметиков, содержащих последовательность ³¹³LCVYQKPGQAFCTCR³²⁷ (SEQ ID NO: 6). Результаты, полученные с использованием миметиков простых эпитопов, не позволяют определить эпитопов. Фиг. 2 иллюстрирует представление в форме тепловой карты для результатов, полученных для антитела FU-HI-3-372 в группе 8 (миметиков не являющегося непрерывным эпитопом). Средний сигнал нанесен на график черным цветом, и чрезвычайно высокий сигнал нанесен на график светлым. Обведенные рамкой области увеличены.

Заключения.

Антитела тестировали против массивов пептидов Pepscan. Являлось возможным идентифицировать предварительные не являющиеся непрерывным эпитопы для всех моноклональных антител. Последовательности пептидов, содержащие эпитопы, перечислены в табл. 3. Антитела 3-266 и AK FUMM 9-11 связывают отдельные не являющиеся непрерывными эпитопы. Антитела FAR02 VH3/VK5 и FU-HI-3-372 имеют в основном очень сходные паттерны связывания при тестировании на массивах, и таким образом, показано, что они узнают один и тот же не являющийся непрерывным эпитоп в доменах FAS1/FAS2.

Таблица 3

Обнаруженные эпитопы		
Антитело	Последовательности эпитопов	Домен
3-266	1030 QWLKSAGITLPADRR ₁₀₄₄	FAS 3
	857 LHARCVSQEGVARCR ₈₇₁	Подобный EGF 6
	435 TMNASLAQQLCRQH ₄₅₀	FAS 1
AK FUMM 9-11	885 PSNPCSHPDRCG ₈₉₆	Подобный EGF 6
	166 FRGSACQECQDPNRF ₁₈₀	Подобный EGF 1
FAR02 VH3/VK5+FU- HI-3-372	420 PFTVLVPSVSSFSSR ₄₃₄	FAS 1
	473 QEITVTFNQFTK ₄₈₄	FAS 1
	390 ATQTGRVFLQ ₃₉₉	FAS 1
	576 DSLRDGRLIYLF ₅₈₇	FAS 2
	615 SKGRILTMANQVL ₆₂₇	FAS 2

Для визуального сравнения предварительных эпитопов, идентифицированных для вышеупомянутых антител, использовали схему, изображенную на фиг. 3. Эта схема адаптирована из фиг. 1 из Kzhyshkowska, TheScientificWorldJOURNAL (2010) 10, 2039-2053, представляющей доменную организацию стабиллина-1 (CLEVER-1). На фиг. 3 схематически проиллюстрирована доменная организация CLEVER-1 (ак_25-1027 как для последовательности-мишени). Стрелками показаны относительные положения идентифицированных мотивов связывания. Обведенными кругами стрелками показаны положения доминантных коров эпитопов.

Пример 2.

Выделение мРНК, RT-ПЦР и клонирование.

мРНК успешно выделена из клеток гибридомы (система PolyA Tract, Promega, кат. № Z5400). RT-ПЦР проводили с использованием вырожденных пулов праймеров для мышиных сигнальных последовательностей с единственным праймером для константной области. мРНК варибельной области тяжелой цепи амплифицировали с использованием группы из шести вырожденных пулов праймеров (HA-HF), и мРНК варибельной области легкой цепи амплифицировали с использованием группы из восьми вырожденных пулов праймеров (κA-κG и λA). Получали продукты амплификации с использованием пула праймеров для тяжелой цепи HD и пулов праймеров для легкой цепи κB, κC и κG, подтверждая, что легкая цепь происходит из кластера κ (фиг. 4). Каждый продукт клонировали, и несколько клонов для каждого секвенировали.

С использованием этого способа, одиночная последовательность VH [SEQ ID NO: 32 (последовательность оснований) и NO: 33 (аминокислотная последовательность)] идентифицирована для пула HD, и одиночная функциональная последовательность Vκ [SEQ ID NO: 34 (последовательность оснований) и NO: 35 (аминокислотная последовательность)] идентифицирована для пула праймеров κG. CDR тяжелой цепи простираются от основания 91 до 111 (SEQ ID NO: 7), от 154 до 210 (SEQ ID NO: 8) и от 298 до 333 (SEQ ID NO: 9); и CDR легкой цепи простираются от основания 70 до 105 (SEQ ID NO: 10), от 151 до 171 (SEQ ID NO: 11) и от 268 до 294 (SEQ ID NO: 12). Определения CDR и нумерация белковой последовательности соответствуют Kabat. Измененный транскрипт легкой цепи κ, в норме ассоциированный с партнером по слиянию гибридомы SP2/0 (GenBank M35669), также идентифицирован для пулов праймеров κB и κC.

Фиг. 4 иллюстрирует разделение в 1% агарозном геле продуктов RT-ПЦР для гибридомы 3-372. Гель окрашивали с использованием красителя SYBR® зеленого (Invitrogen, кат. № S-7567) и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Маркер размера представлял собой GeneRuler™ 1Kb Plus (Fermentas, кат. № SM1331). Квадратные рамки показывают полосы, которые выделяли для клонирования и секвенирования.

Пример 3.

Анализ последовательности.

Анализ последовательностей, полученных из гибридомы, экспрессирующей 3-372, обобщены в табл. 4.

Таблица 4

Анализ последовательности антитела 3-372^a

	H-цепь	L-цепь
Длина CDR 1	7 ак	12 ак
Длина CDR 2	16 ак	7 ак
Длина CDR 3	12 ак	9 ак
Наиболее близкая человеческая зародышевая последовательность ^b	IGHV2-5*10 (73%)	IGKV3D-20*01 (65%)
Наиболее близкая человеческая FW1 ^b	IGHV2-70*06 (73%)	IGKV1D-17*01 (68%)
Наиболее близкая человеческая FW2 ^b	IGHV2-5*09 (86%)	IGKV1D-39*01 (73%)
Наиболее близкая человеческая FW3 ^b	IGHV2-70*13 (72%)	IGKV1D-43*01 (78%)
Наиболее близкий человеческий J ^b	IGHJ1 (91%)	IGKJ4 (80%)

^a Определения CDR и нумерация последовательности соответствуют Kabat.

^b Указаны зародышевый(зародышевые) ID с последующим % гомологии.

Анализ структуры и гомологии последовательности вариабельного домена мышиного 3-372 идентифицировал четыре каркасных остатка в вариабельной области тяжелой цепи и пять каркасных остатков в вариабельной области легкой цепи, которые считают критическими или, возможно, важными для связывания антигена ("ограничивающие остатки"). Дополнительный анализ баз данных последовательностей выявил, что можно обнаружить, что человеческие каркасные фрагменты включают все желательные ограничивающие остатки и все остатки CDR, таким образом позволяя конструирование составных человеческих антител Composite Human Antibodies™.

Отмечено также, что области V 3-372 имеют некоторые необычные признаки. Цепь VH содержит участок N-гликозилирования в начале CDR1, поскольку остаток 30 представляет собой N, и 32 представляет собой S (сигнал N-гликозилирования представляет собой NXS или NXT, где X может представлять собой любую аминокислоту). Благодаря вероятному экспонированию этого мотива на поверхности антитела, является вероятным, что этот участок может быть гликозилирован. Таким образом, может обеспечивать преимущество (если он не вовлечен в связывание антигена) исключение этого участка из составных человеческих антител Composite Human Antibodies, чтобы избежать каких-либо производственных проблем в будущем. Цепь Vκ также содержит участок гликозилирования, но только в контексте человеческой константной области κ, поскольку конечная аминокислота домена Vκ представляет собой аспарагин. Мышиный константный домен κ начинается с RA, в то время как человеческий константный домен κ начинается с RT, таким образом, образуя сигнал гликозилирования. Таким образом, последовательности составных человеческих антител Composite Human Antibodies можно выбирать для исключения этого аспарагина.

Домен κ содержит также неспаренный цистеин в положении 47. Молекулярное моделирование позволяет предполагать, что этот остаток может быть углублен в структуру и таким образом, не являться доступным для дисульфидного связывания; однако, он может являться ключевым остатком для поддержания конформации CDR2 Vκ, и таким образом, последовательности для составных человеческих антител Composite Human Antibodies можно выбирать с этим остатком и без него (последнее включает консенсусный человеческий L в этом положении), чтобы исследовать его эффекты на связывание антигена.

Пример 4.

Экспрессия химерного антитела.

Вариабельные области 3-372 переносили в экспрессирующую векторную систему Antitope для тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG4(S241P). Клетки NS0 трансфицировали посредством электропорации и подвергали отбору с использованием метотрексата (MTX). Ряд устойчивых к MTX колоний идентифицировали с использованием ELISA со связыванием Fc/детекцией цепи каппа, и линии клеток, положительные по экспрессии IgG, последовательно размножали от 96-луночных планшетов до флаконов T175 в средах, содержащих постепенно увеличивающиеся концентрации MTX, и затем замораживали в жидком азоте. На каждой стадии, экспрессию IgG оценивали количественно.

Химерное IgG4 3-372 очищали из супернатантов культур клеток на колонке с сефарозой с белком-A и количественно оценивали по OD280 нм с использованием значения коэффициента экстинкции (Eс(0,1%)) 1,55 на основании прогнозируемой аминокислотной последовательности химерного IgG4. Приблизительно 90 мкг антитела очищали, и образец анализировали посредством восстанавливающего SDS-PAGE (фиг. 5). Наблюдали полосы, соответствующие прогнозируемым размерам тяжелых и легких цепей, без свидетельств какого-либо загрязнения; однако, было заметно, что химерная легкая цепь, по-

видимому, является гликозилированной, что доказывает большая кажущаяся молекулярная масса, чем у мышинной легкой цепи. Тяжелая цепь также казалась движущейся медленнее, чем обычно, что позволяет предполагать, что она также является N-гликозилированной; однако, расщепление гликозидазами необходимо, чтобы показать, что это действительно является причиной.

Фиг. 5 иллюстрирует окрашенный Кумасси синим гель после SDS-PAGE очищенного с использованием белка А химерного IgG4 3-372. 1 мкг образца наносили на гель NuPage 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen, кат. № NP0322BOX) и разделяли при 200 В в течение 30 мин. Дорожки 1 и 4: Предварительно окрашенный белковый стандарт (Fermentas PageRuler, кат. № SM1811). Дорожка 2: 1,0 мкг химерного антитела IgG4 3-372. Дорожка 3: 1,0 мкг мышинного антитела 3-372.

Пример 5.

Связывание химерного антитела с CLEVER-1.

Связывание полученного из NS0 химерного 3-372 с CLEVER-1 оценивали посредством конкурентного ELISA. Кратко, 96-луночный планшет Nunc Immulon maxisorp (Fisher, кат. № DIS-971-030J) покрывали CLEVER-1 при 1 мкг/мл в PBS (100 мкл/лунку) в течение ночи при 4°C, с дополнительным 1 ч при 37°C на следующее утро. Лунки промывали с использованием PBS/0,1% Tween 20 и затем блокировали в течение 45 мин при комнатной температуре, в 1% Marvel/1% BSA/PBS.

Серийные разведения как химерного 3-372, так и эталонного мышинного 3-372 (5-0,078 мкг/мл) предварительно смешивали с постоянной концентрацией (0,6 мкг/мл) биотинилированного мышинного антитела 3-372 в 2% BSA/PBS. Блокированный планшет для ELISA промывали, как ранее, и 100 мкл предварительно смешанных антител добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание биотинилированного мышинного 3-372 с CLEVER-1 детектировали с использованием стрептавидина-HRP (Sigma, кат. № S5512) и однокомпонентного раствора субстрата TMB (Invitrogen, кат. № 00-2023). Реакцию останавливали с использованием 3 М HCl, поглощение считывали при 450 нм в считывателе для планшетов Dynex Technologies MRX TC II, и кривую связывания химерного 3-372 сравнивали с кривой для контрольного мышинного антитела 3-372 (фиг. 6).

На фиг. 6 показан профиль связывания мышинных и химерных антител с CLEVER-1 в конкуренции с биотинилированным мышинным антителом. Кривые были почти идентичными с получением значений IC₅₀ 0,89 мкг/мл для химерного антитела по сравнению с 0,77 мкг/мл для мышинного антитела. Это подтверждает, что правильные последовательности вариабельной области идентифицированы и экспрессированы в химерном антителе.

Пример 6.

Дизайн последовательностей и вариантов вариабельной области составного человеческого антитела Composite Human Antibody™.

Структурные модели областей V мышинного антитела против CLEVER-1 получали с использованием Swiss PDB и анализировали, чтобы идентифицировать важные "ограничивающие" аминокислоты в областях V, которые, вероятно, являются необходимыми для свойств связывания антитела. Остатки, содержащиеся внутри CDR (с использованием определений как Kabat, так и Chothia), вместе с рядом каркасных остатков, считают важными. Последовательности как VH, так и Vκ антитела против CLEVER-1, содержат типичные каркасные остатки, и мотивы CDR 1, 2 и 3 являются сравнимыми со многими мышинными антителами. Однако, авторы настоящего изобретения идентифицировали потенциальный участок N-связанного гликозилирования в последовательности VH (30N) и неспаренный цистеин в последовательности Vκ (47C).

Из вышеуказанного анализа, заключили, что можно получать составные человеческие последовательности антитела против CLEVER-1 с широкими возможностями альтернатив вне CDR, но только с узким диапазоном возможных альтернативных остатков внутри последовательностей CDR. Предварительный анализ показал, что соответствующие фрагменты последовательности из нескольких человеческих антител можно комбинировать для получения CDR, сходных или идентичных с CDR в мышинных последовательностях. Для областей вне CDR и фланкирующих CDR, широкий набор фрагментов человеческих последовательностей идентифицировали в качестве возможных компонентов областей V нового составного человеческого антитела Composite Human Antibody™.

На основании вышеуказанного анализа, большой предварительный набор фрагментов последовательностей, которые можно использовать для получения вариантов составного человеческого антитела Composite Human Antibody™ против CLEVER-1, отобрали и анализировали с использованием технологии iTope™ для анализа in silico связывания пептидов с аллелями MHC класса II человека (Perry et al 2008), и с использованием TCED™ (базы данных Т-клеточных эпитопов) родственных известным последовательностям антител Т-клеточных эпитопов (Bryson et al 2010). Фрагменты последовательности, которые идентифицировали как значимые не относящиеся к человеческой зародышевой линии последовательности, связывающиеся с MHC класса II человека, или которые оценивали как значимые наилучшие совпадения с TCED™, отбрасывали. В результате этого получили уменьшенный набор фрагментов, и их комбинации снова анализировали, как выше, чтобы убедиться, что стыки между фрагментами не содержат потенциальные Т-клеточные эпитопы. Затем выбранные фрагменты комбинировали для получения

последовательностей области V тяжелой и легкой цепи для синтеза. Для антитела против CLEVER-1, сконструировали четыре цепи VH, VH1, VH2; VH3 и VH4 [SEQ ID NO: 13, 15, 17 и 19 (последовательность оснований) и NO: 14, 16, 18 и 20 (аминокислотная последовательность), соответственно], и пять цепей Vk, VK1, VK2, VK3, VK4 и VK5 [SEQ ID NO: 21, 23, 25, 27 и 29 (последовательность оснований) и NO: 22, 24, 26, 28 и 30 (аминокислотная последовательность), соответственно]. CDR тяжелых цепей VH1, VH2, VH3 и VH4 простирались от основания 91 до 111, от 154 до 201 и от 298 до 333; и CDR легких цепей VK1, VK2, VK3, VK4 и VK5 простирались от основания 70 до 105, от 151 до 171 и от 268 до 294. Определения CDR и нумерация белковой последовательности соответствуют Kabat. Следует отметить, что три из цепей VH имеют удаленный потенциальный участок N-связанного гликозилирования (VH2, VH3 и VH4), и две из цепей Vk имеют удаленный неспаренный цистеин (VK4 и VK5).

Пример 7.

Конструирование вариантов составного человеческого антитела Composite Human Antibody™.

Все варианты генов областей VH и Vk составного человеческого антитела Composite Human Antibody™ против Clever 1 синтезировали с использованием серий перекрывающихся олигонуклеотидов, которые гибридизовали, лигировали и амплифицировали посредством ПЦР для получения полноразмерных синтетических областей V. Затем собранные варианты клонировали непосредственно в экспрессирующую векторную систему Antitope pANT для цепей VH и цепей Vk IgG4(S241P) (фиг. 7). Область VH клонировали с использованием участков для MluI и HindIII, и область Vk клонировали с использованием участков рестрикции для BssHII и BamHI. Все конструкции подтверждали посредством секвенирования.

На фиг. 7 показана схема вектора Antitope pANT. Векторы как для Vh, так и для VK, содержат фрагменты геномной ДНК, включающие интроны и последовательности поли-А. Экспрессией обеих цепей управляют посредством промотора CMV, и отбор (для вектора для тяжелой цепи) проводят посредством минигена DHFR.

Пример 8.

Конструирование, экспрессия и очистка антител.

Все комбинации цепей VH и Vk составного IgG4(S241P) (т.е. всего 20 пар) стабильно трансфицировали в клетки NS0 посредством электропорации. Стабильные трансфектанты отбирали с использованием 200 нМ метотрексата (MTX) (Sigma, кат. № M8407), устойчивые к метотрексату колонии для каждой конструкции тестировали по уровням экспрессии IgG с использованием ELISA IgG4, и линии с наилучшей экспрессией отбирали, размножали и замораживали в жидком азоте. Успешной трансфекции и отбора стабильных клонов достигли для всех вариантов, за исключением VH3/Vk3 и VH4/Vk3.

Составные варианты антитела против CLEVER-1 очищали из супернатантов культур клеток на колонке с сефарозой с белком А (GE Healthcare, кат. по. 110034-93), буфер меняли на PBS и количественно оценивали по OD280 нм с использованием коэффициента экстинкции ($E_{c(0,1\%)}=1,55$) на основании прогнозируемой аминокислотной последовательности. Лидирующие варианты составного человеческого антитела Composite Human Antibody™ анализировали посредством восстанавливающего SDS-PAGE. Наблюдала полосы, соответствующие прогнозируемым размерам цепей VH и Vk, без свидетельств какого-либо загрязнения (фиг. 8).

Фиг. 8 иллюстрирует окрашенный Кумасси синим гель после SDS-PAGE очищенных с использованием белка А избранных антител. 2 мкг каждого образца наносили на гель NuPage 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen, кат. № NP0322BOX) и разделяли при 200 В в течение 35 мин. Маркер размера представлял собой предварительно окрашенный белковый стандарт Fermentas PageRuler (кат. № SM1811).

Пример 9.

Связывание составных человеческих антител Composite Human Antibodies™ с CLEVER-1.

Связывание полученных из NS0 составных антител 3-372 с CLEVER-1 оценивали посредством конкурентного ELISA. Серийные разведения как химерных, так и составных антител 3-372 (5-0,078 мкг/мл) предварительно смешивали с постоянной концентрацией (0,6 мкг/мл) биотинилированного мышинового антитела 3-372. Их инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 96-луночном планшете Immulon maxisorp (Fisher, кат. № DIS-971-030J), предварительно покрытом 1 мкг/мл CLEVER-1. Связывание биотинилированного мышинового 3-372 с CLEVER-1 детектировали с использованием стрептавидина-HRP (Sigma, кат. № S5512) и однокомпонентного раствора субстрата TMB (Invitrogen, кат. № 00-2023). Реакцию останавливали с использованием 3 М HCl, поглощение считывали при 450 нм в считывателе для планшетов Dynex Technologies MRX TC II, и кривые связывания наносили на график. Значения IC50 для каждого антитела рассчитывали, и их нормализовали по IC50 химеры, которую включали в каждый соответствующий планшет ELISA.

Полученные IC50 показывают, что ряд составных человеческих антител против CLEVER-1 Composite Human Anti-CLEVER-1 Antibodies™ имеют лучшее связывание с CLEVER-1, чем химерное 3-372. Данные конкуренции для лидирующих вариантов показаны на фиг. 9.

Таблица 5

Характеризация связывания составных человеческих антител против
CLEVER-1 Composite Human anti-CLEVER-1 Antibodies™

ID областей V	Относительная IC50
CH/CK	1,0
VH1/VK1	0,84
VH1/VK2	1,37
VH1/VK3	1,63
VH1/VK4	1,17
VH1/VK5	1,13
VH2/VK1	0,82
VH2/VK2	0,95
VH2/VK3	0,7
VH2/VK4	0,79
VH2/VK5	0,52
VH3/VK1	0,76
VH3/VK2	0,51
VH3/VK3	–
VH3/VK4	0,47
VH3/VK5	0,42
VH4/VK1	1,86
VH4/VK2	0,9
VH4/VK3	–
VH4/VK4	1,2
VH4/VK5	0,46

Относительную IC50 рассчитывали посредством деления значения для тестируемого антитела на значение для химеры, анализированной на том же планшете.

Пример 10. Связывание антител *in vitro*.

Моноциты периферической крови человека собирали от здоровых доноров, и их обогащали из приблизительно 9 мл периферической крови посредством центрифугирования в градиенте фиколла. После этого их рассеивали в 96-луночные планшеты с низким уровнем прикрепления с плотностью $1,2 \times 10^6$ клеток/луночку в среде IMDM, дополненной 1% человеческой АВ сывороткой. Клетки обрабатывали с использованием 1 мкг/мл или 10 мкг/мл антитела против CLEVER-1 3-372 (DSM ACC2520, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 21 августа 2001 г.) или VH3/VK5 (гуманизированного антитела против CLEVER-1 по настоящему изобретению, узнающего указанный специфический эпитоп CLEVER-1) в течение 48 ч. Экспрессию HLA-DR определяли в положительных по CD14 клетках через 48 ч с использованием проточного цитометра LSR Fortessa. Мертвые клетки исключали из анализа на основании положительного сигнала для красителя 7-AAD для определения жизнеспособности клеток.

Человеческие IgG использовали в качестве эталона.

На фиг. 10A показаны результаты определения экспрессии HLA-DR на положительных по CD14 клетках. Экспрессия HLA-DR на положительных по CD14 клетках увеличивалась при обработке гуманизированным антителом против CLEVER-1 VH3/VK5 по сравнению с эталонными человеческими IgG.

Не наблюдали различий в жизнеспособности клеток между обработками. Таким образом, можно заключить, что нацеленные на CLEVER-1 антитела не влияют на выживаемость моноцитов.

Пример 11. Измерение уровня TNF-α.

Моноциты периферической крови человека от здоровых доноров собирали и обогащали, как описано в примере 10. Моноцитам из 3 мл крови, обработанной буфером для лизиса эритроцитов, позволяли осуществлять адгезию в течение ночи на 6-луночных планшетах, промывали один раз с использованием PBS и культивировали в течение 3 суток с 10 мкг/мл антитела против CLEVER-1 3-372 или AK-1.

Уровень растворимого TNF-альфа измеряли в культуральной среде с использованием коммерческого набора для ELISA TNF-альфа (Invitrogen). Результаты измерения показаны на фиг. 10B. Увеличенную секрецию TNF-альфа отмечали в образцах с антителом против CLEVER-1 по сравнению с образцами без обработки или с образцами с контрольной обработкой AK-1.

Пример 12. Модели сингенных злокачественных опухолей на мышах.

Развившиеся карциномы молочной железы мышей E0771 обрабатывали с использованием 5 мг/кг антитела против CLEVER-1 (mStab1) или контроля для изотипа каждые 3-4 суток, пока опухоли не достигали размера 1 мм³. Эффект обработки антителами против CLEVER-1 на привлечение и фенотип TAM, различных подгрупп моноцитов и инфильтрующих опухоль лейкоцитов оценивали с использованием проточной цитометрии.

На фиг. 11A показана реполяризация TAM в сингенных карциномах молочной железы E0771 после введения антитела, связывающегося с CLEVER-1. Реполяризацию TAM измеряют по увеличению популяций макрофагов, экспрессирующих MHCII (HLA-DR человека), по проточной цитометрии. Каждая

точка представляет процент $\text{MHCII}^{\text{high}}\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+$ TAM у одной мыши. Для опухолей, обработанных антителом против CLEVER-1, показан сходный уровень TAM ($\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+$), по сравнению с опухолями после контрольной обработки. Однако популяция TAM в обработанных антителом против CLEVER-1 опухолях состояла из более провоспалительных макрофагов (Ly6CloMHCIIhi) с более низкой экспрессией маркера типа II, CD206.

Обработанные антителом против CLEVER-1 TAM секретируют значительно больше TNF-альфа по сравнению с обработанными IgG TAM, как показано на фиг. 11B. Каждая точка представляет TAM, выделенные от одной мыши. В соответствии с этим, наблюдали также уменьшение количества FoxP3+ инфильтрующих опухоль лейкоцитов.

Результаты показывают, что CLEVER-1 является потенциальной мишенью для нацеленной на макрофаги иммунотерапии.

Пример 13.

Как отмечено в примере 1, антитела 9-11 и 3-372 связываются с отдельными эпитопами на CLEVER-1 человека, и в настоящее время исследуют эффекты этого различия на передачу сигналов в моноцитах периферической крови человека. На фиг. 12 проиллюстрировано, что связывание CLEVER-1 с антителами 9-11 и 3-372 симулирует противоположные эффекты на передачу сигналов mTOR (мишени для механизма действия рапамицина) и c-Jun в моноцитах периферической крови человека.

На фиг. 12A показан анализ проточной цитометрии связывания 9-11 и 3-372 на положительных по CD14 моноцитах человека ($n=2$ донора, D1 и D2).

На фиг. 12B показаны результаты при использовании массива фосфокиназ человека Human Phospho-Kinase Array (R&D) для измерения активации фосфобелков на положительных по CD14 клетках (обогащенных посредством отрицательного отбора) после 10-минутной обработки 20 мкг/мл 9-11 и 3-372. Сигналы фосфорилирования нормализовали по соответствующим клеткам, обработанным контролем для изотипа, IgG2a крысы для 9-11 и IgG1 мыши для 3-372. Как показано на фиг. 12B, антитела 9-11 и 3-372 симулируют противоположные эффекты на передачу сигналов mTOR и c-Jun в моноцитах периферической крови человека. Известно, что путь mTOR регулирует поляризацию макрофагов, и иммуносупрессивный фенотип макрофагов зависит от фосфорилирования c-Jun, где результаты показывают, что антитело 3-372 активирует макрофаги для переключения их фенотипа из макрофагов M2 в макрофаги M1.

Другие предпочтительные варианты осуществления.

Понятно, что средство, способное связываться с CLEVER-1 человека, такое как антитело, одноцепочечный Fv или фрагмент(ы) Fab, пептид(ы), макромолекула(макромолекулы) и гуманизированное антитело или гуманизированный одноцепочечный Fv, или фрагмент(ы) Fab и фармацевтические композиции по настоящему изобретению, можно включать в форме множества вариантов осуществления, только немногие из которых описаны в настоящем описании. Специалисту в данной области очевидно, что другие варианты осуществления существуют и не отклоняются от содержания изобретения. Таким образом, описанные варианты осуществления являются иллюстративными, и их не следует рассматривать как ограничивающие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, способное связываться с общим рецептором-1 эндотелия лимфатической системы и эндотелия сосудов (CLEVER-1) человека, где антитело содержит:

- а) константные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG4 человека, и
- б) комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей IgG человека, выбранную из группы, состоящей из следующих комбинаций:

SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 26,
 SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 30,
 SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 30,
 SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 24 и
 SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 30.

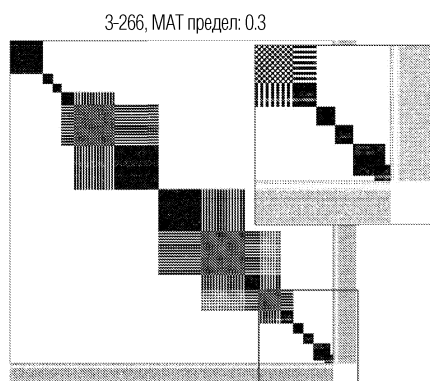
2. Гуманизированное антитело по п.1, где комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей IgG человека предпочтительно выбирают из группы, состоящих из следующих комбинаций: SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 30.

3. Гуманизированное антитело по п.1 или 2, где константная область тяжелой цепи и легкой цепи

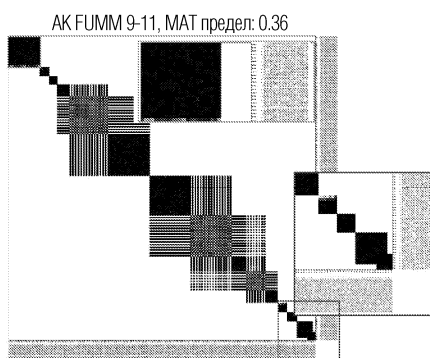
каппа IgG4 человека содержит мутации L248E и/или S241P.

4. Применение гуманизированного антитела по любому из пп.1-3 для лечения злокачественной опухоли посредством уменьшения размера злокачественной опухоли; посредством уменьшения роста злокачественной опухоли у индивидуума; и/или посредством ингибирования трансмиграции злокачественных клеток и образования метастазов.

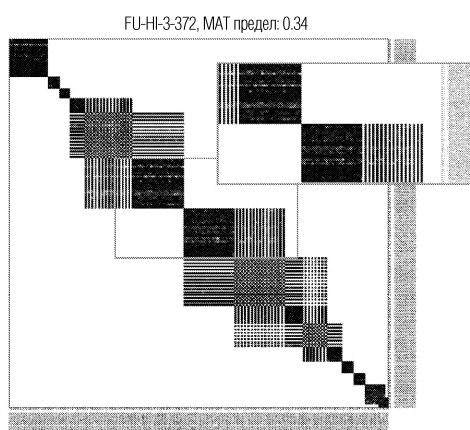
5. Фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное антитело по любому из пп.1-3 и пригодный наполнитель.



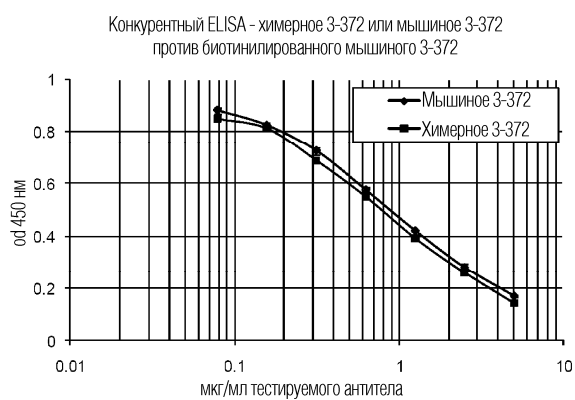
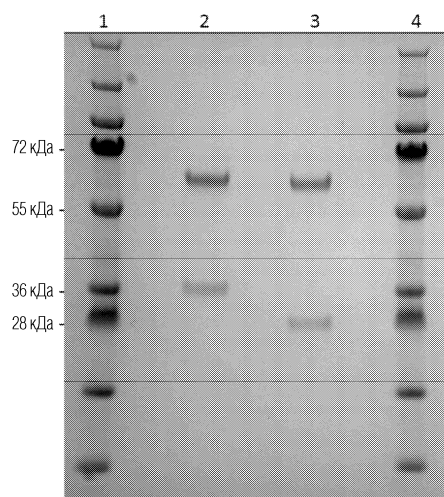
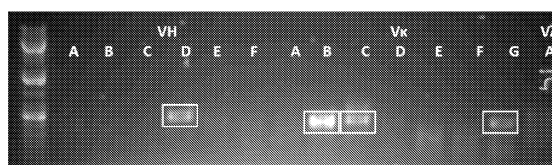
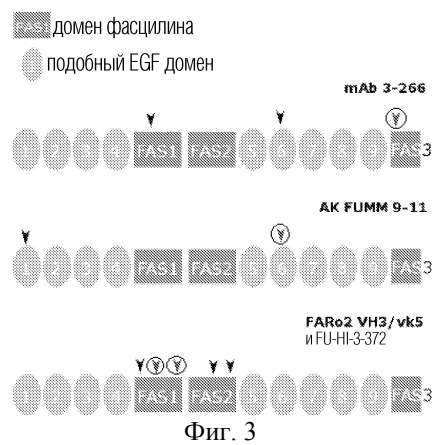
Фиг. 1А

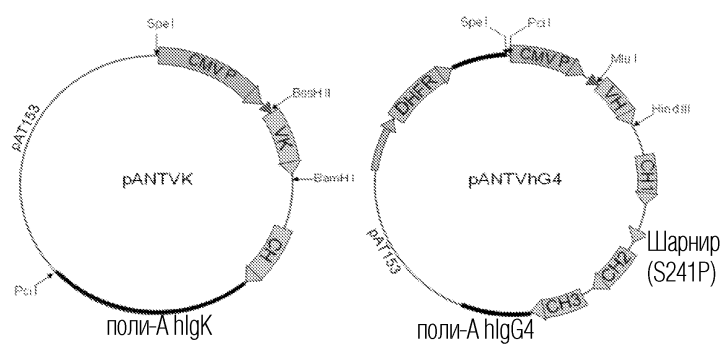


Фиг. 1В

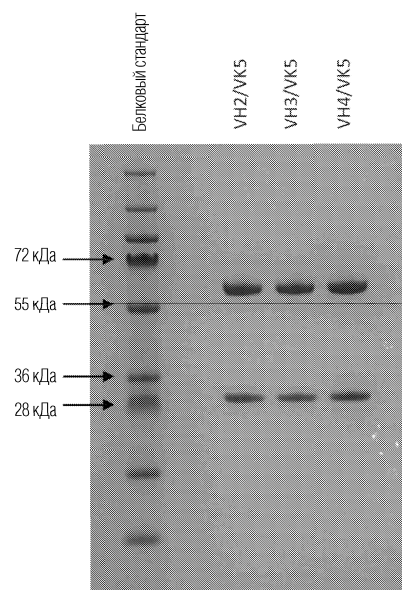


Фиг. 2



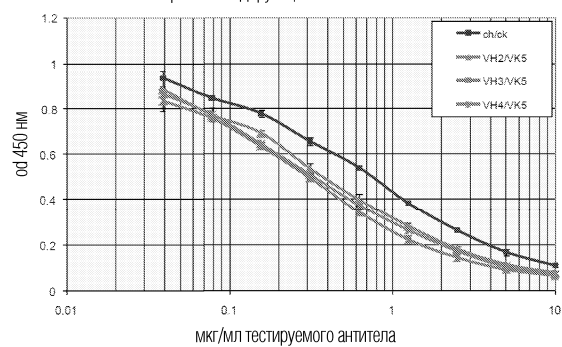


Фиг. 7

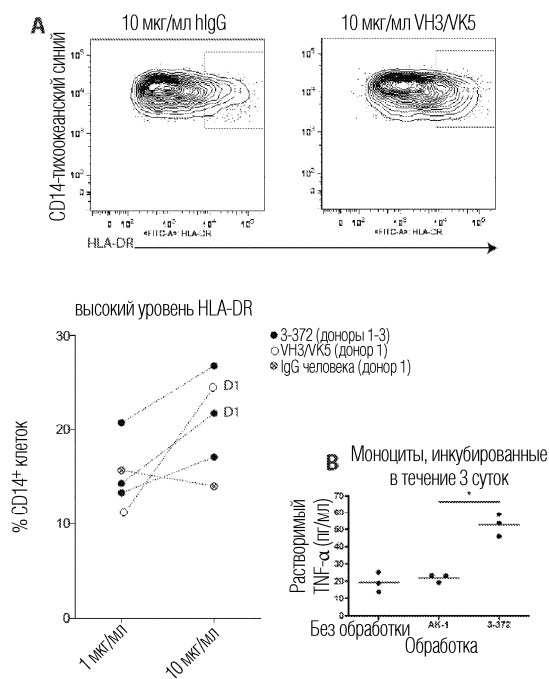


Фиг. 8

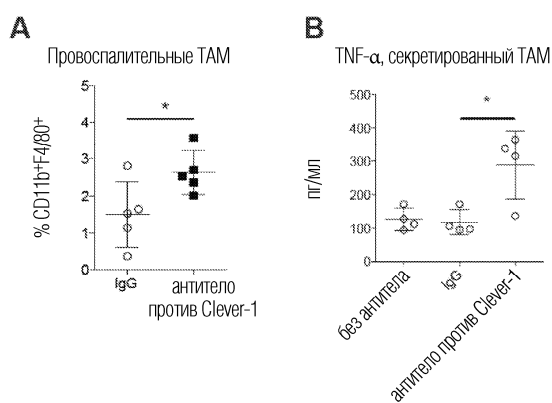
Конкурентный ELISA - Ингибирование связывания биотинилированного мышиного 3-372 с Clever-1 посредством химерного и лидирующих составных антител 3-372



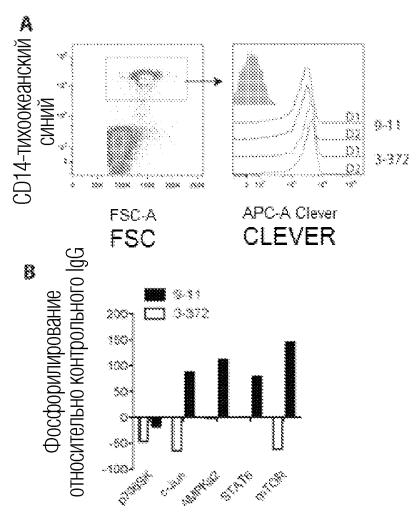
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

