

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290379 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.01

(22) Дата подачи заявки
2020.08.06

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОР ИММУННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ, ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННОГО С ИММУННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКОЙ, ИММУНОСУПРЕССОР, АНТИТЕЛО ПРОТИВ ФИБРОНЕКТИНА ИЛИ ЕГО ПРОИЗВОДНОЕ, АНАЛОГ ФИБРОНЕКТИНА, НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИБРОНЕКТИНА ИЛИ ЕГО НЕПОЛНОГО БЕЛКА

(31) 2019-148423

(32) 2019.08.13

(33) JP

(86) PCT/JP2020/030175

(87) WO 2021/029318 2021.02.18

(71) Заявитель:

ТОХОКУ ЮНИВЕРСИТИ (JP)

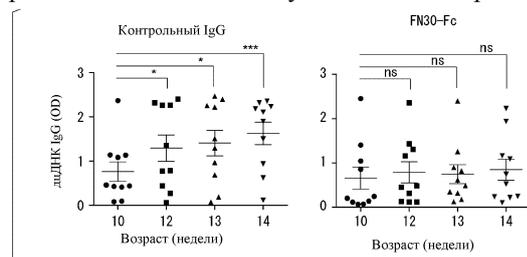
(72) Изобретатель:

Такаи Тосиюки, Инуи Масанори, Су
Мей цу, Эндо Сёта (JP)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предложены ингибитор иммунных контрольных точек, который содержит в качестве активного компонента вещество, которое ингибирует связывание между фибронектином и иммуносупрессивным рецептором LILRB4; терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками; иммуносупрессор, содержащий в качестве активного ингредиента вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4; антитело против фибронектина или его производное, аналог фибронектина, набор для определения фибронектина или его неполного белка; и способ определения фибронектина или его неполного белка в биологическом образце с использованием указанного набора.



202290379

A1

A1

202290379

PCT/JP2020/030175	МПК: <i>A61K 39/395</i> (2006.01)	<i>C07K 16/00</i> (2006.01)
	<i>A61K 45/00</i> (2006.01)	<i>C07K 16/28</i> (2006.01)
	<i>A61P 19/08</i> (2006.01)	<i>C07K 16/30</i> (2006.01)
	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)	<i>C07K 19/00</i> (2006.01)
	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)	<i>C12M 1/34</i> (2006.01)
	<i>A61P 35/04</i> (2006.01)	<i>C12N 15/12</i> (2006.01)
	<i>A61P 37/06</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/04</i> (2006.01)
	<i>A61P 37/08</i> (2006.01)	<i>A61K 38/10</i> (2006.01)
	<i>A61P 43/00</i> (2006.01)	<i>G01N 33/53</i> (2006.01)
	<i>C07K 14/78</i> (2006.01)	

Ингибитор иммунной контрольной точки, терапевтический агент заболевания, связанного с иммунной контрольной точкой, иммуносупрессор, антитело против фибронектина или его производное, аналог фибронектина, набор для определения фибронектина или его неполного белка

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к ингибитору иммунной контрольной точки, к терапевтическому агенту заболевания, связанного с иммунной контрольной точкой, к иммуносупрессору, к антителу против фибронектина или его производному, к аналогу фибронектина, к набору для определения фибронектина или его неполного белка и к способу определения фибронектина или его неполного белка.

В настоящей заявке заявлен приоритет японской патентной заявки № 2019-148423, поданной 13 августа 2019 г в Японии, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В последние годы привлекала внимание иммунотерапия рака с использованием ингибитора иммунной контрольной точки. Ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой агент, который отменяет подавление активации Т-клеток с помощью молекулы иммунной контрольной точки, обладающей эффектом подавления иммунного

ответа на себя и подавления чрезмерной иммунной реакции посредством связывания с молекулой иммунной контрольной точки или ее лигандом так, чтобы ингибировать передачу иммуносупрессивного сигнала.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что путем использования LILRB4 (лейкоцитарного Ig-подобного рецептора B4, ниже также упоминаемого как B4), который представляет собой иммуносупрессивный рецептор для неизвестного лиганда, может быть определено (PTL 1) воспалительное заболевание, вызванное инфекцией или аутоиммунной реакцией.

Недавно в качестве лигандов для LILRB4 были представлены CD166, ApoE (аполипопротеин E), Angptls и тому подобные (NPL 1 - 3). Однако нельзя сказать, что приведены достаточные доказательства, что они являются физиологическим лигандами.

Фибронектин (ниже также упоминаемый как FN) представляет собой гликопротеин массой примерно 259 кДа, присутствующий во внеклеточном матриксе (ниже также упоминаемом как ECM), на клеточной поверхности и в биологической жидкости. Фибронектин разделяют на 6 областей (доменов) посредством обработки термолизинном, который является протеазой. Они называются: 1) фибрин/гепарин-связывающая область (фибрин/гепарин-связывающий-FN), 2) коллаген-связывающая область (коллаген-связывающий-FN), 3) гепарин-связывающая область (гепарин-связывающий-FN), 4) клетка/интегрин-связывающая область (клетка/интегрин-связывающий-домен (CBD)-FN), 5) вторая гепарин-связывающая область (второй гепарин-связывающий-FN) и 6) вторая фибрин-связывающая область (второй фибрин-связывающий-FN) на основе их специфических характеристик молекулярного связывания. Таким образом, FN состоит из нескольких доменов, имеющих разные способности связывания с физиологическими молекулами. Сообщалось, что в случае некоторых аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка (SLE) и ревматоидный артрит (RA), наблюдаются вариации в концентрации FN в плазме или в биологической жидкости (например в суставной жидкости), а также, что анализ доменов для оценки фрагментации FN с использованием моноклонального антитела полезен для диагностики заболевания или оценки его тяжести (NPL 4 - 6). В частности, концентрация фибрин/гепарин связывающего фрагмента-FN составляет 24 ± 12 мкг/мл ($p < 0,003$) при SLE и 36 ± 22 мкг/мл ($p < 0,00002$) при RA по сравнению с этим параметром у здоровых субъектов (61 ± 18 мкг/мл), и ожидается, что этот параметр будет использоваться для диагностики. Кроме того, сообщалось, что FN способствует метастатическому

потенциалу и инвазивному потенциалу клеточной линии рака легких (NPL 7). Однако ни одна из вышеперечисленных работ не сообщала, что FN представляет собой лиганд для LILRB4.

Список цитирования

Патентная литература

PTL 1: JP-A-2018-25554

Непатентная литература

NPL 1: J Immunol. 2018 Feb 1; 200(3): 1207-1219

NPL 2: Blood. 2014 Aug 7; 124(6): 924-935

NPL 3: Nature. 2018 Oct; 562(7728): 605-609

NPL 4: Rheumatology (Oxford). 2007 Jul; 46(7): 1071-1075

NPL 5: J Rheumatol. 1987 Oct; 14(5): 1052-1054

NPL 6: Rheumatol Int. 2013 Jan; 33(1): 37-43

NPL 7: Br J Cancer 2009 Jul 21; 101(2): 327-334

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая задача

Целью настоящего изобретения является предложение ингибитора иммунных контрольных точек, терапевтического агента для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, иммуносупрессора, антитела против фибронектина или его производное, аналога фибронектина, набора для определения фибронектина или его неполного белка и способа определения фибронектина или его неполного белка.

Решение проблемы

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что физиологическим лигандом для LILRB4 является фибронектин, который представляет собой один из основных составляющих белков ЕСМ, идентифицировали целевую последовательность LILRB4 в фибронектине и обнаружили, что вещество, которое ингибирует связывание целевой последовательности с фибронектином, можно использовать в качестве ингибитора иммунных контрольных точек, терапевтического агента для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, и иммуносупрессора, что и позволяет осуществить настоящее изобретение.

Настоящее изобретение включает следующие аспекты.

[1] Ингибитор иммунных контрольных точек, содержащий вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4, в

качестве активного ингредиента.

[2] Ингибитор иммунных контрольных точек в соответствии с [1], где фибронектин связывается с иммуносупрессивным рецептором LILRB4 посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине.

[3] Ингибитор иммунных контрольных точек в соответствии с [1] или [2], где вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4, представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, или аналог фибронектина.

[4] Ингибитор иммунных контрольных точек в соответствии с [3], где антитело против фибронектина или его производное связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине.

[5] Ингибитор иммунных контрольных точек в соответствии с [3], где аналог фибронектина представляет собой любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой от одной до нескольких аминокислот удалены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

[6] Терапевтический агент заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, содержащий вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4, в качестве активного ингредиента.

[7] Терапевтический агент в соответствии с [6], где фибронектин связывается с иммуносупрессивным рецептором LILRB4 посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине.

[8] Терапевтический агент в соответствии с [6] или [7], где вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4,

представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, или аналог фибронектина.

[9] Терапевтический агент в соответствии с [8], где антитело против фибронектина или его производное связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине.

[10] Терапевтический агент в соответствии с [8], где аналог фибронектина представляет собой любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(с) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

[11] Терапевтический агент в соответствии с любым из [6] - [10], где заболевание, связанное с иммунными контрольными точками, выбрано из группы, состоящей из аутоиммунного заболевания, рака, воспалительного заболевания и аллергического заболевания.

[12] Терапевтический агент в соответствии с [11], где рак обусловлен раковыми метастазами.

[13] Терапевтический агент заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, содержащий вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4, в качестве активного ингредиента.

[14] Терапевтический агент в соответствии с [13], где вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4, представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, фибронектин или аналог фибронектина.

[15] Терапевтический агент в соответствии с [14], где аналог фибронектина

представляет собой один из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

[16] Терапевтический агент в соответствии с любым из [13] - [15], где заболевание, связанное с иммунными контрольными точками, представляет собой костное заболевание.

[17] Иммуносупрессор, содержащий вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4, в качестве активного ингредиента.

[18] Иммуносупрессор в соответствии с [17], где вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4, представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, фибронектин или аналог фибронектина.

[19] Иммуносупрессор в соответствии с [18], где аналог фибронектина представляет собой один из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим

сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

[20] Антитело против фибронектина или его производное, которое связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1.

[21] Аналог фибронектина, в котором любой из следующих пептидов (а) - (в) и Fc-фрагмент иммуноглобулина G слиты друг с другом:

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

[22] Набор для определения фибронектина, содержащего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, или его неполного белка, содержащихся в биологическом образце, включающий антитело против фибронектина или его производное в соответствии с [20].

[23] Способ определения фибронектина или его неполного белка в биологическом образце с использованием набора в соответствии с [22].

Полезные эффекты изобретения

В соответствии с настоящим изобретением могут быть предложены ингибитор иммунных контрольных точек, терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, иммуносупрессор, антитело против фибронектина или его производное, аналог фибронектина, набор для определения фибронектина или его неполного белка, и способ определения фибронектина или его неполного белка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 представлены результаты анализа экспрессии В4 (слева), PD-1 (в центре) и Tim-3 (справа) в наивных CD8-положительных Т-клетках мышей дикого типа (вверху) и в В4-дефицитных наивных CD8-положительных Т-клетках (внизу), полученные посредством проточной цитометрии. Вертикальная ось представляет собой

процент клеток, когда пиковое значение гистограммы принимают за 100%, и горизонтальная ось представляет собой интенсивность флуоресценции (интенсивность экспрессии белка). Сплошная линия показывает результат окрашивания каждым антиген-специфическим антителом, а серый цвет без сплошной линии показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 2 показаны результаты анализа экспрессии В4 (слева), PD-1 (центр), и Tim-3 (справа) при активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в CD8-положительных Т-клетках (вверху) и в В4-дефицитных CD8-положительных Т-клетках (внизу) мышей дикого типа, полученных посредством проточной цитометрии во времени (от суток 0 до суток 3). Результаты показаны в виде графика перекрывающихся гистограмм в каждые сутки измерения, где вертикальная ось представляет собой процент клеток, когда пиковое значение гистограммы принято за 100%, а горизонтальная ось представляет интенсивность флуоресценции (интенсивность экспрессии белка). Сплошная линия показывает результат окрашивания каждым антиген-специфическим антителом, а серый цвет без сплошной линии показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 3 показаны результаты анализа экспрессии В4 (слева), PD-1 (центр) и Tim-3 (справа) в наивных CD4-положительных Т-клетках (вверху) и В4-дефицитных наивных CD4-положительных Т-клетках (внизу) мышей дикого типа, полученных посредством проточной цитометрии. Вертикальная ось представляет собой процент клеток, где пиковое значение гистограммы принято за 100%, а горизонтальная ось представляет интенсивность флуоресценции (интенсивность экспрессии белка). Сплошная линия показывает результат окрашивания каждым антиген-специфическим антителом, а серый цвет без сплошной линии показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 4 показаны результаты анализа экспрессии В4 (слева), PD-1 (центр) и Tim-3 (справа) при активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в CD4-положительных Т-клетках (вверху) и В4-дефицитных CD4-положительных Т-клетках (внизу) мышей дикого типа, полученных посредством проточной цитометрии во времени (от суток 0 до суток 3). Результаты показаны в виде графика перекрывающихся гистограмм в каждые сутки измерения, где вертикальная ось представляет собой процент клеток, где пиковое значение гистограммы принято за 100%, а горизонтальная ось представляет интенсивность флуоресценции (интенсивность экспрессии белка).

Сплошная линия показывает результат окрашивания каждым антиген-специфическим антителом, а серый цвет без сплошной линии показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 5 показаны результаты анализа ко-экспрессии В4 и PD-1 при активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в CD8-положительных Т-клетках (вверху) и в CD4-положительных Т-клетках (внизу) мышей, полученные посредством проточной цитометрии во времени (от суток 0 до суток 3). Вертикальная ось представляет интенсивность экспрессии PD-1, горизонтальная ось представляет интенсивность экспрессии В4, область внизу слева, отделенная крестом, указывает на отрицательные по PD-1 и В4 клетки, в области вверху слева указаны только PD-1 положительные клетки, в области вверху справа указаны PD-1 и В4 положительные клетки, а в области внизу справа указаны PD-1 отрицательные и В4 положительные клетки.

На ФИГ. 6 показаны результаты анализа экспрессии В4 (слева), PD-1 (центр), и Tim-3 (справа) при активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в CD8-положительных Т-клетках (вверху) и CD4-положительных Т-клетках (внизу) человека, полученные посредством проточной цитометрии во времени (от суток 0 до суток 3). Результаты показаны в виде графика перекрывающихся гистограмм в каждые сутки измерения, где вертикальная ось представляет собой процент клеток, где пиковое значение гистограммы принято за 100%, а горизонтальная ось представляет интенсивность флуоресценции (интенсивность экспрессии белка). Сплошная линия показывает результат окрашивания каждым антиген-специфическим антителом, а светло-серый цвет показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 7 показаны результаты оценки эффекта ингибирования связывания FN-В4 моноклональным антителом против FN30 в со-культуре человеческих MSC (мезенхимальные стволовые клетки) и репортерных клеток В4-GFP на основании процента GFP(зеленый флуоресцентный белок)-экспрессирующих клеток репортерных клеток В4-GFP. Вертикальная ось в диаграмме представляет размер клетки, горизонтальная ось представляет интенсивность флуоресценции GFP, а числовое значение в диаграмме указывает процент (%) GFP-положительных клеток (в рамке). Гистограмма указывает процент (%) GFP-положительных клеток, когда лечение проводилось каждым антителом.

На ФИГ. 8 показаны результаты окрашивания мышинных, полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток и человеческих, полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток моноклональным антителом против FN30 и выполнения анализа с помощью проточного цитометра. Сплошная линия показывает результат окрашивания моноклональным антителом против FN30, а серый цвет без сплошной линии показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 9 показаны результаты окрашивания мышинной раковой клеточной линии (вверху) и человеческой раковой клеточной линии (внизу) с использованием анти-FN30 моноклонального антитела № 5 и выполнения анализа с использованием проточного цитометра. Сплошная линия показывает результат окрашивания моноклональным антителом против FN30, а серый цвет без сплошной линии показывает результат окрашивания антителом изотипического контроля.

На ФИГ. 10 показаны результаты анализа экспрессии B4 и PD-1 в CD8-положительных Т-клетках, инфильтрованных в опухоль, образованную посредством введения мышам дикого типа клеточной линии B16F10 (вверху, для двух мышей) и клеточной линии 3LL (внизу, для трех мышей), полученные с помощью проточной цитометрии. Вертикальная ось представляет интенсивность экспрессии PD-1, горизонтальная ось представляет интенсивность экспрессии B4, в области внизу слева, отделенной крестом указаны отрицательные по PD-1 и B4 клетки, в области вверху слева указаны только положительные по PD-1 клетки, в области вверху справа указаны положительные по PD-1 и B4 клетки, а в области внизу справа указаны отрицательные по PD-1 и положительные по B4 клетки.

На ФИГ. 11 показаны результаты анализа экспрессии B4 и PD-1 в CD4-положительных Т-клетках, инфильтрованных в опухоль, образованную в результате введения мышам дикого типа клеточной линии B16F10 (вверху, для двух мышей) и клеточной линии 3LL (внизу, для трех мышей), полученные с помощью проточной цитометрии. Вертикальная ось представляет интенсивность экспрессии PD-1, горизонтальная ось представляет интенсивность экспрессии B4, в области внизу слева, отделенной крестом, указаны отрицательные по PD-1 и B4 клетки, в области вверху слева указаны положительные по PD-1 клетки, в области вверху справа указаны положительные по PD-1 и B4 клетки, а в области внизу справа указаны отрицательные по PD-1 и положительные по B4 клетки.

На ФИГ. 12 показаны результаты определения белка с помощью метода Вестерн-блоттинга с использованием антитела против фибронектина в образце человеческой плазмы. Слева показаны результаты окрашивания с использованием поликлонального антитела против фибронектина, а справа представлены результаты окрашивания с использованием моноклональных анти-FN30 антител № 4 и № 5.

На ФИГ. 13 показаны результаты количественного определения полноразмерной молекулы фибронектина и 24 кДа фрагмента фибронектина в плазме здорового человека с использованием антитела против фибронектина. Нелинейное приближение выполняли посредством 4-параметрической логистической регрессии на основе поглощения стандартного белка, и концентрацию рассчитывали по значению поглощения образца. В верхней части показана концентрация фибронектина [А (мкг/мл)], определенная с использованием моноклонального антитела против FN30, а в нижней части показана концентрация фибронектина [В (мкг/мл)], определенная с использованием антитела против FN44.

На ФИГ. 14 показаны коробчатые диаграммы, представляющие первый, второй и третий квартили и максимальное и минимальное значение концентраций полноразмерной молекулы фибронектина и 24 кДа фрагмента фибронектина в плазме здорового человека, полученные с использованием моноклонального антитела против FN. Слева показана концентрация полноразмерной молекулы фибронектина и справа показана концентрация 24 кДа фрагмента фибронектина.

На ФИГ. 15 показаны результаты для введенных внутрибрюшинно мышам BXSB/Yaa контрольного IgG или FN30-Fc и измерение уровня анти-dsDNA IgG в сыворотке.

На ФИГ. 16 показаны результаты для введенных внутрибрюшинно мышам BXSB/Yaa контрольного IgG или анти-gp49B моноклонального антитела H1.1 и измерение уровня анти-dsDNA IgG в сыворотке.

На ФИГ. 17А показаны результаты выполнения H & E окрашивания поверхности легких через 30 суток после инъекции клеток карциномы легкого Льюис (LLC) мышам дикого типа (WT) B6 и gp49B-дефицитным мышам через хвостовую вену. WT показывает результаты у мышей дикого типа, а gp49B^{-/-} показывает результаты у gp49B-дефицитных мышей.

На ФИГ. 17В показаны результаты количественного определения числа метастатических очагов в легких через 30 суток после введения клеток карциномы

легкого Льюис (LLC) мышам дикого типа (WT) B6 и gp49B-дефицитным мышам через хвостовую вену.

На ФИГ. 17C показаны результаты выполнения окрашивания H & E печени через 30 суток после введения клеток карциномы легкого Льюис (LLC) мышам дикого типа (WT) B6 и gp49B-дефицитным мышам через хвостовую вену. WT показывают результаты для мышей дикого типа, а gp49B-/- показывают результаты для gp49B-дефицитных мышей.

На ФИГ. 17D показаны результаты количественного определения числа метастатических очагов в печени через 30 суток после введения клеток карциномы легкого Льюис (LLC) мышам дикого типа (WT) B6 и gp49B-дефицитным мышам через хвостовую вену.

На ФИГ. 18A показаны результаты выполнения окрашивания H & E поверхности легких через 20 суток после введения мышинных клеток меланомы B16F10 мышам дикого типа (WT) B6 и gp49B-дефицитным мышам через хвостовую вену. WT означает мышей дикого типа, а gp49B-/- означает gp49B-дефицитных мышей.

На ФИГ. 18B показаны результаты выполнения окрашивания H & E печени через 20 суток после введения мышинных клеток меланомы B16F10 мышам дикого типа (WT) B6 и gp49B-дефицитным мышам через хвостовую вену. WT означает мышей дикого типа, а gp49B-/- означает gp49B-дефицитных мышей.

На ФИГ. 19 показаны результаты выполнения адоптивного переноса клеток костного мозга мышей дикого типа или клеток костного мозга gp49B-дефицитных мышей. Слева показаны результаты окрашивания H & E легких (вверху) и печени (внизу), а справа показано количество метастатических очагов в легких (вверху) и в печени (внизу). WT-R означает мышей дикого типа, а gp49B-/-R означает gp49B-дефицитных мышей.

На ФИГ. 20A показан график введения контрольного антитела изотипа IgG, моноклонального антитела против PD-1, моноклонального антитела против gp49B или комбинации моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B мышам дикого типа (WT) B6 после введения мышам мышинных клеток меланомы B16F10.

На ФИГ. 20B представлено изображение, показывающее метастатические состояния легких и печени мышей, у которых возникла опухоль B16F10, при введении контрольного антитела изотипа IgG, моноклонального антитела против PD-1,

моноклонального антитела против gp49B, или комбинации моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B мышам дикого типа (WT) B6 после введения мышинных клеток меланомы B16F10 мышам. Наверху показаны узелки опухоли легких, а внизу показаны H & E-окрашенные изображения печени.

На ФИГ. 20C представлена диаграмма сравнения числа узелков опухоли легких у соответствующих обработанных антителом групп, где контрольное антитело изотипа IgG, моноклональное антитело против PD-1, моноклональное антитело против gp49B, или комбинацию моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B вводили мышам дикого типа (WT) B6 после введения мышинных клеток меланомы B16F10 мышам.

На ФИГ. 20D представлена диаграмма сравнения числа метастатических очагов B16F10 в печени у соответствующих обработанных антителом групп, где контрольное антитело изотипа IgG, моноклональное антитело против PD-1, моноклональное антитело против gp49B или комбинацию моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B вводили мышам дикого типа (WT) B6 после введения мышинных клеток меланомы B16F10 мышам.

На ФИГ. 20E показан график введения контрольного антитела изотипа IgG, моноклонального антитела против PD-1, моноклонального антитела против gp49B или комбинации моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B мышам дикого типа (WT) B6 после введения клеток карциномы легкого Льюис (LLC) мышам.

На ФИГ. 20F показаны результаты биолюминесценции *in vivo* у мышей дикого типа (WT) B6, которым были введены клетки карциномы легкого Льюис (LLC) через 21 сутки после введения контрольного антитела изотипа IgG, моноклонального антитела против PD-1, моноклонального антитела против gp49B, или комбинации моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B после инъекции мышам клеток LLC.

На ФИГ. 20G показаны результаты выполнения анализа биолюминесценции со средним диаметром (фотоны/с/см²/стерадиан) на основании изображений *in vivo* биолюминесценции мышей дикого типа (WT) B6, которым были инъецированы клетки карциномы легкого Льюис (LLC) через 21 сутки после введения контрольного антитела изотипа IgG, моноклонального антитела против PD-1, моноклонального антитела против gp49B или комбинации моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального

антитела против gp49B после инъекции мышам клеток LLC, и выполнения сравнения среди соответствующих обработанных антителом групп.

На ФИГ. 21 показаны результаты анализа патологических срезов легкого и печени мышей дикого типа (WT) B6, которым были инъецированы клетки карциномы легкого Льюис (LLC), и после этого были введены контрольное антитело изотипа IgG, моноклональное антитело против PD-1, моноклональное антитело против gp49B или комбинация моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B. Наверху показано окрашивание H & E поверхности легкого, а внизу показано окрашивание H & E печени. Стрелки указывают положения метастатических очагов рака.

На ФИГ. 22 показаны результаты индукции дифференцировки клеток костного мозга в остеокласты путем добавления контрольного антитела изотипа IgG, моноклонального антитела против gp49B H1.1, фрагмента F(ab')₂ анти-gp49B моноклонального антитела H1.1 или анти-FN30 моноклонального антитела № 6. На фотографиях показаны TRAP-окрашенные изображения остеокластов и на диаграмме показана степень индукции дифференцировки в результате добавления соответствующих антител. На фотографии и диаграмме Моск указывает на отсутствие добавления антитела.

На ФИГ. 23 показаны TRAP-окрашенные изображения остеокластов при добавлении анти-LILRB4 моноклонального антитела ZM4.1 (правое изображение) или мышиных IgG1к (левое изображение).

На ФИГ. 24 показаны результаты индукции дифференцировки в остеокласты клеток костного мозга мышей дикого типа B6 или gp49B-дефицитных мышей. Слева расположенная фотография показывает TRAP-окрашенное изображение остеокластов, дифференцированных из клеток костного мозга мышей дикого типа B6, а справа расположенная фотография показывает TRAP-окрашенное изображение остеокластов, дифференцированных из клеток костного мозга gp49B-дефицитных мышей. На диаграмме показаны уровни индукции дифференцировки, когда дифференцировка в остеокласты была индуцирована из клеток костного мозга мышей дикого типа B6 и клеток костного мозга gp49B-дефицитных мышей соответственно. WT означает мышей дикого типа B6, а gp49B-/- и KO означает gp49B-дефицитных мышей.

На ФИГ. 25 показаны TRAP-окрашенные изображения остеокластов в бедренных костях мышей дикого типа B6 и gp49B-дефицитных мышей. Слева расположенная

картинка показывает TRAP-окрашенное изображение остеокластов мышей дикого типа B6, а справа расположенная картинка показывает TRAP-окрашенное изображение остеокластов gr49B-дефицитных мышей.

ОПИСАНИЕ ВОПЛОЩЕНИЙ

Ингибитор иммунных контрольных точек

Ингибитор иммунных контрольных точек по настоящему изобретению содержит в качестве активного ингредиента вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4. Фибронектин может связываться с LILRB4 посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине. То есть, аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 1, представляет собой целевую последовательность для LILRB4 в фибронектине.

Вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с LILRB4, конкретно не ограничено, при условии, что оно представляет собой вещество, обладающее активностью ингибирования связывания между фибронектином и LILRB4, но примером является антитело против фибронектина или его производное, антитело против LILRB4 или его производное, аналог фибронектина или тому подобное.

Антитело против фибронектина может быть либо моноклональным антителом, либо поликлональным антителом, при условии, что оно представляет собой антитело, которое взаимодействует с фибронектином, но предпочтительно используют моноклональное антитело. Антитело может быть получено хорошо известным способом. Например, при получении поликлонального антитела, в качестве животного, которое нужно иммунизировать, используют мышь, крысу, хомяка, кролика, козу, овцу, курицу или тому подобных. Антисыворотка может быть получена из сыворотки после введения антигена под кожу или в кожу, в брюшную полость животного или тому подобное однократно или несколько раз. При использовании белка или пептида в качестве антигена, предпочтительной является иммунизация смесью с замещающей жидкостью, имеющей иммуностимулирующий эффект,

Кроме того, моноклональные антитела могут быть получены в соответствии с известным способом получения моноклональных антител, например, описанным в "Monoclonal Antibody" соавторами Yoshiaki Nagamune и Hiroshi Terada, Hirokawa Shoten Co., Ltd. (1990), или в "Monoclonal Antibody", Jame W. Golding, 3rd edition, Academic Press, 1996. Кроме того, моноклональные антитела также могут быть получены методом

ДНК-иммунизации и могут быть получены со ссылкой на Nature 1992 Mar 12; 356 152-154 или J. Immunol Methods Mar 1; 249 147-154.

В качестве антигена, используемого в производстве антител, могут быть использованы фибронектин или его частичный фрагмент (пептид), или вектор, интегрированный с кДНК, кодирующей фибронектин, или его частичный фрагмент. Для того, чтобы получить моноклональное антитело, которое ингибирует связывание фибронектина с LILRB4, предпочтительно использовать пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, которая является целевой последовательностью для LILRB4 в фибронектине. Вектор фибронектина, который представляет собой конструкцию, включающую ген, кодирующий пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, можно использовать как оптимальный ген антигена для иммунизации. Метод ДНК-иммунизации может быть выполнен путем подкожной инъекции вышеупомянутой конструкции гена, одного или в смеси, животному (мышь, крысе и тому подобному) так, чтобы ввести его в клетки животного, подлежащего иммунизации, используя любой из различных методов переноса генов (например внутримышечную инъекцию, электропорацию, генную пушку или тому подобное).

Моноклональное антитело против фибронектина может быть получено способом, в котором полученную обычным способом гибридому культивируют и антитело выделяют из культурального супернатанта, или способом, в котором гибридому вводят млекопитающему, совместимому с гибридомой, и антитело собирают как асцит. Кроме того, моноклональное антитело против фибронектина также может быть получено с использованием известной техники рекомбинации генов. В частности, моноклональное антитело, которое должно быть произведено с помощью гибридомы, полученной выше, может быть получено путем клонирования гена, кодирующего антитело, получения вектора, содержащего этот ген, трансформации клетки-хозяина путем введения вектора в клетку-хозяина с получением клетки, которая экспрессирует моноклональное антитело против фибронектина, и культивирования этой клетки. Клетка, используемая в таком получении, тип вектора, тип клетки, условия культивирования и т.д. находятся в рамках технических возможностей специалистов в данной области, и соответствующие условия могут быть установлены по мере необходимости.

Антитело можно использовать после его очистки по мере необходимости. Примеры способа очистки и выделения антитела включают обычные известные способы,

например высаливание, такое как метод осаждения сульфатом аммония, метод гелевой фильтрации с использованием Sephadex или тому подобного, ионообменную хроматографию и метод аффинной очистки с использованием колонки с протеином А или тому подобного.

Примеры производных антитела против фибронектина включают фрагменты $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv и $scFv$ моноклонального антитела против фибронектина, его мутант и слитый белок или слитый пептид, содержащий антительный компонент. Производное антитела против фибронектина может быть получено в соответствии с известным способом получения производного антитела.

Антитело против фибронектина или его производное связываются с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине или с частью этой последовательности. В случае ингибитора иммунных контрольных точек по настоящему изобретению антитело против фибронектина или его производное может ингибировать связывание фибронектина с LILRB4 посредством связывания с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине или с частью этой последовательности.

Антитело против LILRB4 может быть либо моноклональным антителом, либо поликлональным антителом, при условии, что оно представляет собой антитело, которое связывается с LILRB4, но предпочтительно используют моноклональное антитело. Антитело против LILRB4 может быть получено таким же способом, что и антитело против фибронектина.

В качестве антигена, используемого при получении антитела против LILRB4 можно использовать белок LILRB4 или его частичный фрагмент (пептид), или вектор, интегрированный с кДНК, кодирующей белок LILRB4. Для того, чтобы получить моноклональное антитело, которое узнает конформацию LILRB4, вектор с полноразмерным LILRB4, который представляет собой конструкцию, включающую полноразмерный ген человеческого LILRB4, является оптимальным геном антигена для иммунизации, однако, в дополнение к этому, также можно использовать конструкцию, в которую встроена неполная область последовательности LILRB4, в качестве гена антигена для иммунизации. В качестве неполной области последовательности LILRB4, предпочтительной является область LILRB4, в которой аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 1, то есть целевая последовательность LILRB4 в фибронектине, связывается с LILRB4 (сайт связывания в фибронектине).

Метод ДНК-иммунизации может быть выполнен посредством подкожного введения животному (мышь, крысе, или тому подобному) вышеупомянутой генной конструкции отдельно или в смеси так, чтобы ввести ее в клетку, с использованием любого из различных методов переноса генов (например внутримышечной инъекции, электропорации, генной пушки или того подобного), животного, которого следует иммунизировать.

Очистка антитела против LILRB4 может быть выполнена таким же способом, что и антитела против фибронектина. Примеры производных антитела против LILRB4 включают $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab, Fv и scFv антитела против LILRB4, его мутант и слитый белок, или слитый пептид, содержащий антительный компонент.

В ингибиторе иммунных контрольных точек по настоящему изобретению, антитело против LILRB4 или его производное может ингибировать связывание фибронектина с LILRB4 посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине.

Измерение ингибирования связывания между фибронектином и LILRB4 может быть выполнено посредством оценки ингибирования связывания фибронектина с клеткой, которая экспрессирует LILRB4. Клетка, которая экспрессирует LILRB4, конкретно не ограничена, при условии, что она представляет собой клетку, экспрессирующую LILRB4, но, например, примерами являются клетки селезенки, лейкоциты периферической крови, клетки костного мозга или В-клетки, выделенные из них, плазматические клетки, моноциты или макрофаги, дендритные клетки, эозинофилы, базофилы, нейтрофилы, тучные клетки, активированные Т-клетки и тому подобные.

Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность LILRB4 может быть известна из базы данных, предоставленной Национальным центром биотехнологической информации (NCBI). В случае человеческого (*Homo sapiens*) LILRB4, примерами являются, например, Entrez Gene ID: 11006 (от 17 июня 2019 г), и RefSeq Protein ID: NP_001265355.2, NP_001265356.2, NP_001265357.2, NP_001265358.2, и NP_001265359.2 (соответствующие изоформам 1 - 5). В случае мышинного (*Mus musculus*) LILRB4, примерами являются Gene ID: 14728 (от 24 июня 2016 г) и NP_038560.1, а в случае крысиного (*Rattus norvegicus*) LILRB4, примерами являются Gene ID: 292594 (от 18 апреля 2019 г) и RefSeq Protein ID: NP_001013916, при этом известно, что другие животные также имеют LILRB4. Настоящее изобретение не ограничено вышеприведенными LILRB4, и другие LILRB4 также включены в LILRB4

по настоящему изобретению.

Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность фибронектина может быть известна из базы данных, предоставленной Национальным центром биотехнологической информации (NCBI). В случае человеческого (*Homo sapiens*) фибронектина примером являются, например, Entrez Gene ID: 2335, RefSeq Protein ID: NP_997647, NP_001352447, XP_005246463 и тому подобные. В случае мышинного (*Mus musculus*) фибронектина примером является Gene ID: 14268, и в случае крысиного (*Rattus norvegicus*) фибронектина примером являются Gene ID: 25661 и RefSeq Protein ID: NP_062016, и известно, что другие животные также имеют фибронектин. Настоящее изобретение не ограничено вышеприведенными фибронектинами и другие фибронектины также включены в фибронектин в настоящем изобретении.

Фибронектин связывается с LILRB4, присутствующим на клеточной поверхности плазматической клетки, Т-клетки, макрофага или тому подобного, посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине, и активирует молекулу иммунной контрольной точки. Другими словами, LILRB4 демонстрирует иммуносупрессивную функцию путем связывания с фибронектином посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 в фибронектине.

В настоящем изобретении аналог фибронектина включает любой аналог фибронектина, при условии, что он ингибирует связывание фибронектина с LILRB4, и, примером является, например, любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

Идентичность аминокислотной последовательности составляет 80% или более, но предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более, а еще более предпочтительно 98% или более. Кроме того, число делеций, замен или добавлений в аминокислотную последовательность составляет предпочтительно 1-5, более предпочтительно 1-4, еще более предпочтительно 1-3, а еще более предпочтительно 1-2. Идентичность аминокислотной последовательности может быть определена посредством поиска Blast, представленного в базе данных GenBank.

Аналог фибронектина может быть аналогом фибронектина, в котором любой из вышеприведенных пептидов (a) - (v) и Fc-фрагмент иммуноглобулина G слиты друг с другом.

Аналог фибронектина может быть получен известным методом, например методом рекомбинации генов.

Ингибитор иммунных контрольных точек по настоящему изобретению содержит вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с LILRB4, в качестве активного ингредиента, и может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или добавку.

Примеры носителя и добавки включают воду, физиологический раствор, фосфатный буферный раствор, декстрозу, глицерин, фармацевтически приемлемый органический растворитель, такой как этиловый спирт, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксивиниловый полимер, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилат натрия, альгинат натрия, водорастворимый декстран, карбоксиметилкрахмал натрия, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую камедь, аравийскую камедь, казеин, агар, полиэтиленгликоль, диглицерин, глицерин, пропиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, человеческий сывороточный альбумин, маннитол, сорбитол, лактозу и поверхностно-активное вещество, но не ограничиваются ими.

Ингибитор иммунных контрольных точек по настоящему изобретению может быть сформирован в различных формах, например в виде жидкости (например инъекции), дисперсии, суспензии, таблетки, пилюли, порошка, суппозитория и тому подобного. Предпочтительным воплощением является инъекция, которую предпочтительно вводят парентерально (например внутривенно, трансдермально, внутривнутрино или внутримышечно).

Ингибитор иммунных контрольных точек по настоящему изобретению может быть использован в качестве терапевтического агента для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками.

Доза ингибитора иммунных контрольных точек по настоящему изобретению составляет, например, от 0,025 до 50 мг/кг, предпочтительно от 0,1 до 50 мг/кг, и более предпочтительно может составлять от 0,1 до 25 мг/кг, и еще более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг или от 0,1 до 3 мг/кг, но не ограничивается этим.

Терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками

Терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, по настоящему изобретению содержит в качестве активного ингредиента вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с LILRB4.

Вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с LILRB4, конкретно не ограничено, при условии, что оно представляет собой вещество, обладающее активностью ингибирования связывания между фибронектином и LILRB4, но примерами является антитело против фибронектина или его производное, антитело против LILRB4 или его производное, аналог фибронектина и тому подобные. В качестве анти-фибронектинового антитела или его производного, могут быть приведены в качестве примера антитело против LILRB4 или его производное и аналог фибронектина, описанные выше.

В настоящем изобретении заболевание, связанное с иммунными контрольными точками, конкретно не ограничено, при условии, что оно представляет собой заболевание, в которое вовлечен LILRB4, который является молекулой иммунной контрольной точки, но, например, примерами являются аутоиммунное заболевание, рак, воспалительное заболевание, аллергическое заболевание и тому подобное.

Примеры аутоиммунных заболеваний включают Базедову болезнь, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото, диабет I типа, системную красную волчанку, васкулит, болезнь Аддисона, полимиозит, дерматомиозит, псориаз, синдром Шегрена, системную склеродермию и гломерулонефрит.

Примеры рака включают рак легких, рак толстой кишки, рак почек, злокачественную меланому, лимфому Ходжкина, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак печени, рак простаты, остеосаркому и лейкемию. Рак может быть первичным или метастатическим, однако терапевтический агент предпочтительно

используют при метастатическом раке.

Примеры воспалительного заболевания включают системную красную волчанку, дерматомиозит, болезнь Кавасаки, псориаз, опоясывающий герпес, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), бронхиальную астму, атопический дерматит, ревматоидный артрит, синдром антифосфолипидных антител, полимиозит, васкулитический синдром, синдром Шегрена, болезнь Бехчета, Базедову болезнь, болезнь Хашимото, миокардит, синдром аортита, язвенный колит, болезнь Крона, первичный билиарный цирроз, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный панкреатит, рассеянный склероз, миастению гравис, синдром Гийена-Барре, гломерулонефрит, АНЦА(антинейтрофильные цитоплазматические антитела)-ассоциированный нефрит, амилоидоз, синдром ТИНУ (тубулоинтерстициальный нефрит с увеитом), раздражительную пневмонию, эозинофильную пневмонию и саркоидоз.

Примеры аллергических заболеваний включают аллергический ринит, бронхиальную астму, крапивницу/атопический дерматит, опоясывающий герпес, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), аллергический конъюнктивит, пищевую аллергию, анафилаксию, аутоиммунную гемолитическую анемию, тромбоцитопению, гранулоцитопению, неонатальную гемолитическую желтуху, сывороточную болезнь, пневмонит повышенной чувствительности, волчаночный нефрит (хронический гломерулонефрит), системную красную волчанку, контактный дерматит, болезнь Хашимото, болезнь Бехчета и реакцию отторжения или болезнь "трансплантат против хозяина" (GVHD) после трансплантации органа.

Терапевтический агент заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, по настоящему изобретению может содержать в качестве активного ингредиента вещество, которое активирует LILRB. Вещество, которое активирует LILRB4, конкретно не ограничено, при условии, что оно представляет собой вещество, которое активирует LILRB4 посредством связывания с LILRB4, но, например, примером является антитело против фибронектина или его производное, антитело против LILRB4 или его производное, фибронектин или аналог фибронектина, или тому подобное. В качестве анти-фибронектинового антитела или его производного, примером являются антитело против LILRB4 или его производное, и фибронектин или аналог фибронектина. Однако в терапевтическом агенте для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, содержащем вещество, которое активирует LILRB4, в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению, антитело против фибронектина или

его производное, антитело против LILRB4 или его производное, и фибронектин или аналог фибронектина активирует LILRB4 посредством связывания с LILRB4 так, чтобы проявить иммуносупрессивную функцию LILRB4.

В терапевтическом агенте для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, содержащем вещество, которое активирует LILRB4, в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению, заболевание, связанное с иммунными контрольными точками, конкретно не ограничено, при условии, что оно представляет собой заболевание, на которое терапевтический агент оказывает терапевтический эффект посредством активации LILRB4 так, чтобы подавить иммунную функцию, но, например, примером является такое заболевание костей как ревматоидный артрит, мраморная болезнь или остеопороз и тому подобные. Вещество, которое активирует LILRB4 по настоящему изобретению, например, может лечить заболевание костей путем подавления пролиферации остеокластов.

Терапевтический агент заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или добавку. В качестве фармацевтически приемлемого носителя и добавки примерами являются те, которые описаны выше.

Терапевтический агент заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, по настоящему изобретению может быть сформован в различные формы, например жидкость (например для инъекций), дисперсию, суспензию, таблетки, пилюлю, порошок, суппозиторий и тому подобное. Предпочтительным воплощением является инъекция, которую предпочтительно вводят парентерально (например внутривенно, трансдермально, внутривентриально или внутримышечно).

Доза терапевтического агента для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, по настоящему изобретению, составляет, например, от 0,025 до 50 мг/кг, предпочтительно от 0,1 до 50 мг/кг, и более предпочтительно может составлять от 0,1 до 25 мг/кг, и еще более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг или от 0,1 до 3 мг/кг, но не ограничивается этим.

Иммуносупрессор

Иммуносупрессор по настоящему изобретению содержит в качестве активного ингредиента вещество, которое активирует LILRB4. В качестве вещества, которое активирует LILRB4 примерами являются вещества, являющиеся примерами терапевтического агента для заболевания, связанного с иммунными контрольными

точками. В иммуносупрессоре, содержащем в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению вещество, которое активирует LILRB4, антитело против фибронектина или его производное, антитело против LILRB4 или его производное, фибронектин или аналог фибронектина активирует LILRB4 посредством связывания с LILRB4 так, чтобы проявить иммуносупрессивную функцию LILRB4. Иммуносупрессор по настоящему изобретению может быть применен в трансплантационной терапии.

Иммуносупрессор по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или добавку. В качестве фармацевтически приемлемого носителя и добавки примерами являются описанные выше.

Иммуносупрессор по настоящему изобретению может быть сформован в различные формы, например жидкость (например для инъекции), дисперсию, суспензию, таблетку, пилюлю, порошок, суппозиторий и тому подобное. Предпочтительным воплощением является инъекция, которую предпочтительно вводят парентерально (например внутривенно, трансдермально, внутрибрюшинно или внутримышечно).

Доза иммуносупрессора по настоящему изобретению составляет, например, от 0,025 до 50 мг/кг, предпочтительно от 0,1 до 50 мг/кг, и более предпочтительно может составлять от 0,1 до 25 мг/кг, и еще более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг или от 0,1 до 3 мг/кг, но не ограничивается этим.

Набор для определения фибронектина и способ определения фибронектина

Набор для определения фибронектина или его неполного пептида по настоящему изобретению включает антитело против фибронектина или его производное, которое связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и может определять фибронектин или его неполный пептид в биологическом образце.

Биологический образец конкретно не ограничен и его примеры включают кровь, слюну, мочу, спинномозговую жидкость, аспират костного мозга, плевральный выпот, асцит, суставную жидкость, слезную жидкость, водянистую жидкость, жидкую часть стекловидного тела и лимфатическую жидкость.

В наборе по настоящему изобретению неполный пептид фибронектина конкретно не ограничен, при условии, что он связывается с антителом против фибронектина или его производным, но предпочтительно представляет собой неполный пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, и имеющий молекулярную массу 24 кДа.

В набор по настоящему изобретению, кроме антитела против фибронектина или его производного, которое связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, может быть включен другой составной элемент, необходимый для определения фибронектина, например буферный раствор для взаимодействия или реакционный сосуд.

Фибронектин или его неполный пептид в биологическом образце может быть определен с использованием набора для определения фибронектина или его неполного пептида по настоящему изобретению.

Способ определения фибронектина или его неполного пептида в биологическом образце конкретно не ограничен, при условии, что включено антитело против фибронектина или его производное, которое связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и фибронектин или его неполный пептид в биологическом образце могут быть определены, но предпочтительно выполнять измерение посредством иммунологического метода с использованием антител против фибронектина или его производного. В качестве иммунологического метода используют, например, иммуноокрашивание (Вестерн-блоттинг), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), сэндвич-ELISA, иммунопреципитацию, иммунотурбидиметрию (TIA или LTIA), иммуноферментный анализ, хемилюминесцентный иммуноанализ, флуоресцентный иммуноанализ, метод проточной цитометрии или тому подобные, и он может быть выполнен путем обнаружения полосы, или пятна, или пика, соответствующих молекулярной массе фибронектина или его неполного пептида, но метод не ограничен этим.

Примеры

Ниже настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры, но настоящее изобретение не ограничивается следующими примерами.

Пример 1. Экспрессия LILRB4 в мышинных Т-клетках

В 48-луночный планшет (производство Thermo Fisher Scientific, Inc., #150687), добавляли 100 мкл PBS(-) буферного раствора, содержащего антитело к мышинному CD3 (производство BD Biosciences, Inc., Клон: 145-2C11, #553058) и антитело к мышинному CD28 (производство BD Biosciences, Inc., Клон: 37.51, #553298) в концентрации 10 мкг/мл каждое для покрытия лунок этим раствором при комнатной температуре на 30 минут, с последующим промыванием лунок три раза 500 мкл PBS(-) буферного раствора. Клетки селезенки, полученные из селезенки самки gp49B-дефицитной мыши или мыши

дикого типа в возрасте 10 недель, были подвергнуты гемолитической обработке и после этого суспендированы в среде RPMI-1640 (производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #R8758), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (производство BioWest, #S1530), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (производство FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #139-06861) и 1% раствор пенициллина (5000 Ед/мл)/стрептомицина (5000 мкг/мл) (производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #P4458). Обратите внимание, что GP49B является молекулой, гомологичной человеческому LILRB4 у мышей.

В лунки, покрытые антителами, высевали суспендированные клетки селезенки в концентрации 1×10^6 клеток/200 мкл/лунка и культивировали при 37°C, в условиях 5% двуокиси углерода в течение 0 - 3 суток. Клетки извлекали из лунок и затем суспендировали в PBS(-) буфере, содержащем 2% фетальной бычьей сыворотки и 0,05% азида натрия (производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #S8032), и окрашивали при температуре льда FITC-меченным антителом против мышинового CD4 (производство BioLegend, Клон: GK1.5, #100406), Alexa 647-меченным антителом против мышинового CD8a (производство BD Biosciences, Inc., Клон: 53-6.7, #557882), PE-меченным антителом против мышинового gp49A/B (производство BioLegend, Клон: H1.1, #144904), BV421-меченным антителом против мышинового PD-1 (производство BioLegend, Клон: 29F.1A12, #135218), или PerCP-Cy5.5-меченным антителом против мышинового Tim-3 (производство BioLegend, Клон: B8.2C12, #134012), или антителом изотипического контроля, PE-меченным IgG серого хомячка (производство BioLegend, Клон: НТК888, #400908), BV421-меченным крысиным IgG2a (производство BioLegend, Клон: RТК2758, #400549) или PerCP-Cy5.5-меченным крысиным IgG1 (производство BioLegend, Клон: RТК2071, #400426) и измеряли с помощью клеточного сортера BD FACS Aria III (производство BD Biosciences, Inc.), и данные анализировали про помощи программы FlowJo (производство BD Biosciences, Inc.). Результаты представлены на Фиг. 1 - 5.

На Фиг. 1 показана экспрессия B4, PD-1 и Tim-3 в мышинных наивных CD8-положительных Т-клетках. Как показано на Фиг. 1, в мышинных наивных CD8-положительных Т-клетках наблюдалась незначительная экспрессия PD-1, а экспрессии B4 и Tim-3 не наблюдалась совсем. Кроме того, влияния делеции B4 на экспрессию PD-1 или Tim-3 не было обнаружено.

На Фиг. 2, показана экспрессия B4, PD-1 и Tim-3 после стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в мышинных CD8-положительных Т-клетках. Как показано на Фиг. 2, в результате активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28

антителом, экспрессия PD-1 на мышинных CD8-положительных Т-клетках была почти максимальной на 1 сутки, а экспрессия В4 и Tim-3 слегка возрастала на 1 сутки и была максимальной на 2 сутки и после этого, следовательно, можно предположить, что их экспрессия регулировалась отлично от экспрессии PD-1. В В4-дефицитных CD8-положительных Т-клетках не наблюдалось влияния активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом на экспрессию PD-1, но наблюдалось ослабление экспрессии Tim-3.

На Фиг. 3 показана экспрессия В4, PD-1 и Tim-3 в мышинных наивных CD4-положительных Т-клетках. Как показано на Фиг. 3, в мышинных наивных CD4-положительных Т-клетках наблюдалась слабая, но очевидная экспрессия PD-1, а экспрессии В4 и Tim-3 не наблюдалась. Кроме того, не наблюдалось влияния делеции В4 на экспрессию PD-1 или Tim-3.

На Фиг. 4 показана экспрессия В4, PD-1 и Tim-3 после стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в мышинных CD4-положительных Т-клетках. Как показано на Фиг. 4, в результате активации стимуляции анти-CD3 антителом/ анти-CD28 антителом, экспрессия PD-1 на мышинных CD4-положительных Т-клетках была практически максимальной на 1 сутки, а экспрессия В4 и Tim-3 незначительно возрастала на 1 сутки и достигала максимума на 2 сутки и после этого и, следовательно, можно предположить, что его экспрессия регулировалась отлично от экспрессии PD-1. В В4-дефицитных CD4-положительных Т-клетках влияние активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом на экспрессию PD-1 не наблюдалось, но наблюдалось ослабление экспрессии Tim-3.

На Фиг. 5 показана экспрессия В4 и PD-1 после стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом в мышинных CD8-положительных Т-клетках и CD4-положительных Т-клетках. Как показано на Фиг. 5, и в мышинных CD8-положительных Т-клетках, и в CD4-положительных Т-клетках сначала увеличивается экспрессия PD-1, а затем, позднее, увеличивается экспрессия В4 и, следовательно, оба типа Т-клеток становятся двойными PD-1- и В4-положительными клетками.

Из вышеприведенных результатов было выявлено, что В4 экспрессировался в мышинных Т-клетках и являлся молекулой иммунной контрольной точки, отличной от PD-1 и Tim-3.

Пример 2. Экспрессия LILRB4 в человеческих Т-клетках

В 48-луночный планшет (производство Thermo Fisher Scientific, Inc., #150687)

добавляли 100 мкл PBS(-) буферного раствора, содержащего антитело против человеческого CD3 (производство BD Biosciences, Inc., Клон: UCHT1, #555329) и антитело против человеческого CD28 (производство BD Biosciences, Inc., Клон: CD28.2, #555725) в концентрации 10 мкг/мл каждое, для покрытия лунок при комнатной температуре на 30 минут, с последующим промыванием лунок три раза 500 мкл PBS(-) буферным раствором. Замороженные мононуклеарные клетки человеческой периферической крови (производство C.T.L.) быстро размораживали в теплой бане при 37°C и суспендировали в среде RPMI-1640 (производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #R8758), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 1% раствор пенициллина (5000 Ед/мл)/стрептомицина (5000 мкг/мл) и 20 Ед/мл ДНКазы I (производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #D5025) и культивировали в течение ночи и после этого их выделяли. Т-клетки очищали с использованием набора для выделения человеческих Т-клеток Naive Pan T cell Isolation, (производство Miltenyi Biotec К.К., #130-097-095) и суспендировали в среде, не содержащей ДНКазы I и имеющей вышеприведенный состав. В покрытые антителами лунки высевали суспендированные Т-клетки в концентрации 1×10^6 клеток/200 мкл/лунка и их культивировали при 37°C в условиях 5% двуокси углерода в течение 0 - 3 суток. Клетки выделяли из лунок и затем суспендировали в PBS(-) буфере, содержащем 2% фетальной бычьей сыворотки и 0,05% азида натрия, и окрашивали при температуре льда с использованием FITC-меченного антитела против человеческого CD4 (производство BioLegend, Клон: RPA-T4, #300506), Alexa 647-меченного антитела против человеческого CD8 (производство BioLegend, Клон: RPA-T8, #301022), PE-меченного антитела против человеческого CD85k (LILRB4) (производство eBioscience, Inc., Клон: ZM4.1, #12-5139-42), BV421-меченного антитела против человеческого PD-1 (производство BioLegend, Клон: EH12.2H7, #329920) или PerCP-Cy5.5-меченного антитела против человеческого Tim-3 (производство BioLegend, Клон: F38-2E2, #345016) или антитела изотипического контроля, PE-меченного мышиного IgG1, k (производство eBioscience, Inc., Клон: P3.6.2.8.1, #12-4714-42), BV421-меченного мышиного IgG1 (производство BioLegend, Клон: MOPC-21, #400158) или PerCP-Cy5.5-меченного мышиного IgG1 (производство BD Biosciences, Inc., Клон: MOPC-21, #552834), и измеряли с помощью клеточного сортера BD FACS Aria III (производство BD Biosciences, Inc.), и данные анализировали с помощью программы FlowJo (производство BD Biosciences, Inc.).

На Фиг. 6 показана экспрессия B4, PD-1 и Tim-3 после стимуляции анти-CD3

антителом/анти-CD28 антителом в человеческих CD8-положительных Т-клетках и CD4-положительных Т-клетках. Как показано на Фиг. 6, в человеческих CD8-положительных Т-клетках и CD4-положительных Т-клетках, экспрессия любого из В4, PD-1 и Tim-3 не наблюдалась без стимуляции (в 0 сутки). Однако увеличение экспрессии В4 наблюдалось при активации стимуляции анти-CD3 антителом/анти-CD28 антителом так же, как в случае PD-1 и Tim-3.

Из вышеприведенных результатов было выявлено, что В4 экспрессировался в человеческих Т-клетках и являлся молекулой иммунной контрольной точки, отличной от PD-1 и Tim-3.

Пример 3. Анализ сайта связывания фибронектина с LILRB4

Человеческий фибронектин транслируется с различных изоформ мРНК, транскрибируемых с единичного гена, расположенного в 2q35 и, как правило, состоит из 2240 - 2483 аминокислотных остатков, включающих сигнальный пептид из 26 остатков. Фибронектин существует, как растворимый димер в плазме, и существует, как димер или мультимер на клеточной поверхности или во внеклеточном матриксе (ECM). Димерный фибронектин имеет структуру, в которой два по существу идентичных полипептида 210 кДа - 250 кДа соединены с помощью двух дисульфидных связей около С-конца, и каждый полипептид состоит из многих функциональных модулей, и эти модули имеют свойство связываться с другими белками, включающими фибрин, коллаген, интегрин, гепарин, синдекан и фибронектин.

Для того, чтобы идентифицировать сайт связывания В4 в фибронектине, аффинность связывания В4 анализировали, подвергая отдельные домены, включающие эти модули, анализу с использованием репортерных клеток и анализу BLI (биослойной интерферометрии).

Анализ BLI проводили следующим образом, используя Blitz. Человеческий His-меченный LILRB4 был иммобилизован на сенсоре Ni-NTA, а несвязанные белки отмывали фосфатным буфером (PBS). Сенсор погружали в тестируемый белок и затем погружали в PBS для диссоциации. Кривую регрессии и обработку данных выполняли с помощью программы Blitz Pro.

Анализ с использованием репортерных клеток выполняли посредством трансфекции гибридной мышью Т-клеточной линии, которая экспрессирует репортерный ген NFAT-GFP и DAP12, ретровирусным вектором с использованием химерного рецептора, в котором внеклеточным доменом является человеческий LILRB4,

а каждый из трансмембранного домена и внутриклеточного домена являются активированным парным иммуноглобулин-подобными рецептором-бета, культивирования полученных 5×10^4 репортерных клеток с тестируемым белком и анализа экспрессии GFP (зеленый флуоресцентный белок) посредством проточной цитометрии.

В результате N-концевой катепсином D переваренный 70 кДа полипептидный фрагмент человеческого фибронектина и N-концевой 30 кДа фрагмент, который представляет собой его переваренный трипсином фрагмент, имели аффинность связывания, а 45 кДа фрагмент на C-конце не обладал аффинностью связывания в анализе с использованием репортерных клеток и VLI анализе. Фрагмент в области, расположенной ближе к C-концу фибронектина, то есть аминокислотные остатки 607 - 1265, 1266 - 1908 и 1277 – 2477, не индуцировал сигнала ни в анализе с использованием репортерных клеток, ни в VLI анализе. Из результатов было показано, что сайт связывания B4 в фибронектине присутствует в N-концевом фрагменте 30 кДа (FN30).

Кроме того, после создания пептидной карты посредством перекрытия 8 остатков на каждые 20 аминокислотных остатков FN30, оказалось, что только аминокислотная последовательность от Cys123 до His142 (CysThrCysIleGlyAlaGlyArgGlyArgIleSerCysThrIleAlaAsnArgCysHis) индуцировала заметный сигнал в репортерных клетках. Аминокислотная последовательность от Cys123 до His142 фибронектина представлена SEQ ID NO: 1. Из результатов было выявлено, что фибронектин связывался с B4 посредством аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1.

Пример 4. Получение рекомбинантного слитого белка целевой последовательности фибронектина - Fc

Рекомбинантный белок (ниже также упоминаемый как FN30-Fc), в котором N-концевой 30 кДа фрагмент человеческого фибронектина (соответствующий фрагменту от остатка глутамина в положении 40 до остатка глицина в положении 282, производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #9911, ниже также упоминаемый как FN30) был слит с Fc мышинового IgG2a, был получен посредством следующей процедуры.

Фрагмент ДНК, кодирующий FN30, амплифицировали с мРНК, полученной из человеческих мезенхимальных стволовых клеток, с использованием следующих праймеров.

FN30 Прямой праймер: 5'-ATAGAATTCGCAGTCCCCGGTGGCTGTCAGT-

3'(SEQ ID NO: 2)

FN30 Обратный праймер: 5'-ТТААГАТСТТССГСТСГАТГТГГТСТГСАС-

3'(SEQ ID NO: 3)

Аmplифицированный фрагмент ДНК FN30 переваривали с помощью EcoRI и BglII и встраивали в соответствующие сайты вектора pFUSE-mIgG2Ae1-Fc2. Этот вектор представляет собой вектор, полученный в результате введения мутаций L235E, E318A, K320A и K322A в Fc-фрагмент, чтобы уменьшить антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), присущую Fc IgG2a.

Полученная плазмида pFUSE-mIgG2Ae1-Fc2/FN30 была подтверждена путем проведения анализа последовательности и затем использована для экспрессии белка. Для экспрессии FN30-Fc эту плазмиду трансфицировали в клетки CHO-K1 с использованием Lipofectamine 2000, и стабильно трансфицированные клеточные клоны были отобраны с использованием Zeocin (0,8 мг/мл), и затем получены методом серийных разведений. Рекombинантную FN30-Fc выделяли из супернатанта клеточной культуры с помощью колонки HiTrap Protein G HP и затем подвергали диализу против PBS(-).

Пример 5. Получение антитела против фибронектина

Крыс WKY иммунизировали фрагментом 30 кДа с N-конца (FN30; производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #9911) фибронектина, который был получен путем обработки человеческого, полученного из плазмы фибронектина катепсином D и затем обработки полученного фрагмента 70 кДа трипсином, с последующей очисткой посредством использования аффинности связывания гепарина, в качестве антигена, и клетки подвздошных лимфатических узлов были слиты с клетками миеломы в присутствии 50% полиэтиленгликоля, в результате чего были получены гибридомы. Выполняя выделение посредством ELISA с использованием человеческого FN30, FN30-Fc, полученного в Примере 4, мышинового FN (производство Abcam. plc, #ab92784) и синтетического пептидного фрагмента FN30, были получены 9 клонов гибридом, которые продуцируют моноклональное антитело против фибронектина (ниже также упоминаемое как “анти-FN30 моноклональное антитело”). Название клона, изотип, аффинность связывания мышинных MSC и аффинность связывания человеческих MSC установленных 9 типов анти-FN30 моноклональных антител показаны в Таблице 1. В этой таблице (-) указывает на отсутствие аффинности связывания, (+) указывает слабую аффинность связывания, и (++) указывает сильную аффинность связывания.

Таблица 1

Номер антитела	Изотип (крысиный IgG)	Аффинность связывания мышинных MSC	Аффинность связывания человеческих MSC
1	IgG2b	-	-
2	IgG2a	-	-
3	IgG2b	-	-
4	IgG2a	++	++
5	IgG2a	++	++
6	IgG2b	++	++
7	IgG2c	+	+
8	IgG2a	-	-
9	IgG2a	-	+

Пример 6. Блокирующее действие антитела против фибронектина

Мезенхимальные стволовые клетки из человеческого костного мозга (производство PromoCell GmbH, #C-12974) суспендировали в ростовой среде для мезенхимальных стволовых клеток (производство PromoCell GmbH, C-28009) и высевали в 48-луночный планшет в количестве 1×10^5 клеток/300 мкл/лунка и культивировали при 37°C в условиях 5% двуокиси углерода. Среду удаляли путем аспирации в состоянии, когда мезенхимальные стволовые клетки достаточно прикреплялись к планшету после 24-часового культивирования, и 300 мкл PBS(-) буферного раствора, содержащего каждое из анти-FN30 моноклональных антител (№. 1 - № 9), полученных в Примере 5, в количестве 20 мкг/мл добавляли туда, и взаимодействие осуществляли при 37°C в течение 1 часа. После этого PBS(-) буферный раствор, содержащий анти-FN30 моноклональное антитело, удаляли путем аспирации, лунки дважды промывали 500 мкл среды RPMI-1640, содержащей 0,5% фетальной бычьей сыворотки, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола и 1% раствор пенициллина (5000 Ед/мл)/стрептомицина (5000 мкг/мл), и GFP-репортерные клетки с B4 химерным рецептором (клетки B4-2B4) или контрольные GFP-репортерные клетки (клетки 2B4), не экспрессирующие химерный рецептор, суспендированные в среде RPMI-1640 с таким же составом, высевали в количестве 1×10^5 клеток/200 мкл/лунка и культивировали при 37°C в условиях 5% двуокиси углерода в течение 18 часов. После извлечения клеток из лунок, эти клетки суспендировали в PBS(-) буферном растворе, содержащем 2% фетальной

бычьей сыворотки и 0,05% азида натрия и измеряли посредством проточной цитометрии BD FACS Calibur (производство BD Biosciences, Inc.), и данные анализировали с помощью программы FlowJo. Результаты показаны на Фиг. 7.

Как показано на Фиг. 7, когда обработку осуществляли с помощью анти-FN30 моноклональных антител №№ 1 - 5 и 7 - 9, была показана экспрессия GFP, эквивалентная экспрессии положительного контроля без антитела, однако, когда обработку осуществляли с использованием анти-FN30 моноклонального антитела № 6, экспрессия GFP была эквивалентна экспрессии отрицательного контроля только репортерных клеток. Следовательно, можно сказать, что антитело № 6 представляет собой антитело, которое ингибирует связывание FN30 с B4.

Пример 7. Перекрестная реактивность каждого моноклонального антитела против человеческого FN30 (окрашивание мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга мышей (MSC), и мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека)

Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга мышей (производство Cyagen Biosciences, Inc., #MUBMX-01001), и мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга человека, извлеченные из планшетов посредством пипетирования, без выполнения ферментативной обработки или тому подобного суспендировали в PBS(-) буферном растворе, содержащем 2% фетальной бычьей сыворотки и 0,05% азида натрия, обрабатывали каждым из анти-FN30 моноклональных антител, полученных в Примере 5, или PE-меченым крысиным IgG1k (производство BD Biosciences, Inc., Клон: R3-34, #553925) при температуре льда, промывали и затем окрашивали PE-мечеными IgG поликлональными антителом козы против крысы (производство BioLegend, #405406) и измеряли с помощью проточного цитометра BD FACS Calibur, и данные анализировали с помощью программы FlowJo. Результаты показаны на Фиг. 8.

Как показано на Фиг. 8, анти-FN30 моноклональные антитела №№. 4, 5, и 6 сильно окрашивали как мышинные MSC, так и человеческие MSC, а антитело № 7 слабо окрашивало мышинные MSC и человеческие MSC. Антитело № 9 слабо окрашивало только человеческие MSC. Антитела №№ 1, 2, 3 и 8 не окрашивали никакие MSC.

Пример 8. Экспрессия фибронектина (FN30) на клеточной поверхности в человеческих и мышинных раковых клеточных линиях

Мышинные раковые клеточные линии: B16F10 (меланома) и 3LL (рак легкого

Льюис), и человеческие раковые клеточные линии: Daudi (лимфома Беркитта), HL60 (промиелоцитарный лейкоз), HeLa (цервикальная эпителиоидная карцинома), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) и Saos-2 (остеосаркома), извлеченные из планшетов пипетированием без осуществления ферментативной обработки или тому подобного, суспендировали в PBS(-) буферном растворе, содержащем 2% фетальной бычьей сыворотки и 0,05% азида натрия, обрабатывали анти-FN30 моноклональным антителом (№ 5) или PE-меченным крысиным IgG2ak (производство BD Biosciences, Inc., Клон: R35-95, #554689) при температуре льда, промывали и затем окрашивали Alexa 488-меченным IgG поликлональными антителами козы против кролика (производство Invitrogen, Inc., #A-11006) и измеряли с помощью проточного цитометра BD FACS Calibur, и данные анализировали с помощью программы FlowJo. Результаты показаны на Фиг. 9.

Как показано на Фиг. 9, было обнаружено, что экспрессия фибронектина (FN30) на клеточной поверхности мышинных раковых клеточных линий была слабой в B16F10 и сильной в 3LL. В человеческих раковых клеточных линиях экспрессия на клеточной поверхности не наблюдалась в Daudi, HL60 и HeLa, а сильная экспрессия на клеточной поверхности наблюдалась в HepG2 и Saos-2.

Пример 9. Экспрессия B4 и PD-1 во внутриопухолевых инфильтративных лимфоцитах

В левое бедро мыши дикого типа вводили подкожно клетки B16F10 или 3LL в количестве 5×10^5 клеток/100 мкл/мышь, и после этого мышь усыпляли посредством чрезмерного вдыхания двуокиси углерода на стадии, когда диаметр опухоли достигал примерно 1,5 см. Затем опухоль извлекали и готовили суспензию из одиночных клеток с использованием набора для диссоциации опухоли Tumor Dissociation Kit, мышинный (производство Miltenyi Biotec К.К., #130-096-730) и gentleMACS диссоциатора (производство Miltenyi Biotec К.К., #130-093-235), а лимфоциты получали посредством разделения в градиенте удельной плотности, используя Перколл (производство GE Healthcare, Inc., #17089102). Извлеченные клетки суспендировали в PBS(-) буфере, содержащем 2% фетальной бычьей сыворотки и 0,05% азида натрия и окрашивали при температуре льда FITC-меченным антителом против мышинового CD4, Alexa 647-меченным антителом против мышинового CD8a, PE-меченным антителом против мышинового gp49A/B или BV421-меченным антителом против мышинового PD-1 или антителом изотипического контроля, PE-меченным IgG серого хомячка, или BV421-

меченным крысиным IgG2a, и измеряли при помощи клеточного сортера BD FACS Aria III, и данные анализировали с помощью программы FlowJo. Результаты показаны на Фиг. 10 и 11.

На Фиг. 10 показана экспрессия B4 и PD-1 во внутриопухолевых инфильтративных лимфоцитах (мышинные CD8-положительные Т-клетки). Как показано на Фиг. 10, экспрессию B4 и PD-1 наблюдали в некоторых CD8-положительных Т-клетках, инфильтрованных в опухоль B16F10, и большинство из них были двойными B4- и PD-1-позитивными клетками, а также наблюдались одиночные B4-позитивные клетки. Большинство CD8-позитивных Т-клеток, инфильтрованных в опухоль 3LL, были позитивными по B4, и 80% или более из них также были позитивными по PD-1.

На Фиг. 11 показана экспрессия B4 и PD-1 внутриопухолевых инфильтративных лимфоцитов (мышинные CD4-положительные Т-клетки). Как показано на Фиг. 11, экспрессия B4 и PD-1 наблюдалась в некоторых CD4-положительных Т-клетках, инфильтрованных в опухоль B16F10, а также наблюдались двойные B4- и PD-1-позитивные клетки и одиночные B4-позитивные клетки. Большинство CD4-положительных Т-клеток, инфильтрованных в опухоль 3LL, были двойными B4- и PD-1-позитивными клетками.

Пример 10. Обнаружение белка в образце плазмы с использованием поликлонального антитела против фибронектина и моноклонального антитела против фибронектина (метод Вестерн-блоттинг)

В качестве образца плазмы использовали кровь здоровых мужчин (возраст от 25 до 31 лет) и 10,5 мл/человека крови собирали в вакуумную пробирку для сбора крови Venoject II (зарегистрированная торговая марка), и плазму разделяли и отделяли посредством центрифугирования при 2500 об/мин в течение 3 минут с использованием универсальной центрифуги с охлаждением (KUBOTA S911).

Образцы плазмы разбавляли в 15 раз особо чистой водой, и к ней добавляли восстановитель (1 М β -ME) и поверхностно-активное вещество (4% SDS), и полученную смесь подвергали нагреванию при 95°C в течение 5 минут, и затем выполняли электрофорез в 7,5% акриламидном геле в восстанавливающих условиях. После электрофореза отделенный белок переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Полученные блоты окрашивали с использованием Pierce ECL Western Blotting Substrate производства Thermo Fisher Scientific, Inc. в качестве субстрата после добавления каждого из анти-FN поликлонального антитела и анти-FN30

моноклональных антител №№ 4 и 5, полученных в Примере 5, в качестве первичных антител и каждого из антитела против кроличьего IgG-HRP (производство Cell Signaling Technology, Inc., #7074) и антитела против крысиного IgG-HRP (производство BioLegend, Клон: Poly4054, #405405), в качестве вторичного антитела. В анализе изображений использовали ImageQuant LAS 4000 mini, произведенный GE Healthcare, Inc. Результаты показаны на Фиг. 12.

Как показано на Фиг. 12, полоса 250 кДа была подтверждена при использовании анти-FN30 моноклональных антител №№ 4 и 5. Полоса, имеющая молекулярную массу примерно 24 кДа, наблюдалась при использовании либо анти-FN поликлонального антитела, либо анти-FN30 моноклонального антитела, и было подтверждено существование FN-фрагмента 24 кДа в здоровой человеческой плазме.

Пример 11. Количественное определение полноразмерной молекулы фибронектина и 24 кДа фрагмента фибронектина в плазме здорового человека с использованием антитела против фибронектина (метод ELISA)

Использовали анти-FN30 моноклональное антитело № 6, полученное в Примере 5, анти-FN44 кДа антитело (производство OriGene Technologies, Inc., клон: OT13F9, ниже также упоминаемое как “анти-FN44 антитело”) с использованием коллаген-связывающего-FN в качестве антигена, и антитело против фибронектина, продуцируемое в кролике (производство Sigma-Aldrich Co. LLC, #F3648, ниже также упоминаемое как “анти-FN поликлональное антитело”), то есть поликлональное антитело, и в 96-луночном планшете (производство Greiner Bio-One GmbH, MICROLON (зарегистрированная торговая марка) каждое моноклональное антитело разбавляли до конечной концентрации 4 мкг/мл карбонатным буфером (NaHCO_3 , 0,01 M), и планшет покрывали им путем выстаивания при 4°C в течение 12 часов. После блокирования планшета PBS, содержащим 1% BSA, к планшету добавляли стандартный белок FN (производство R & D systems, Inc., Fibronectin ELISA DuoSet) и плазму здорового человека.

Количество фибронектина, связанного с моноклональным антителом, определяли используя анти-FN поликлональное антитело (13500-кратное разведение) и антитело к кроличьему IgG-HRP (250-кратное разведение). В промывке планшета между каждой операцией использовали TBS (трис-буферный солевой раствор) с 0,1% Tween 20. После добавления субстрата измеряли поглощение при длине волны 450 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (производство Bio-Rad Laboratories, Inc.,

Model 680) и оцифровывали.

Нелинейное приближение выполняли посредством 4-параметрической логистической регрессии на основе поглощения стандартного белка, и концентрацию рассчитывали по значению поглощения образца. Результаты показаны на Фиг. 13. Концентрация фибронектина [А (мкг/мл)], определенная с использованием анти-FN30 моноклонального антитела и концентрация фибронектина [В (мкг/мл)], определенная с использованием анти-FN44 антитела, показаны на Фиг. 13.

Когда полноразмерная молекула фибронектина представлена как x мкг/мл, 24 кДа-дефицитный фибронектин представлен как y мкг/мл, и 24 кДа фибронектин представлен как z мкг/мл, они удовлетворяют соотношению следующей формулы, считая, что 24 кДа-дефицитный фибронектин и 24 кДа фибронектин оба являются продуктами деградации, и поликлональное антитело, с которым связывается вторичное антитело примерно пропорционально молекулярной массе.

[Мат. 1]

$$A = x + y, \quad B = x + z, \quad y = \frac{227}{24} z$$

Из этой формулы x , y и z рассчитывают в соответствии со следующими формулами.

[Мат. 2]

$$x = \frac{227}{203} A - \frac{24}{203} B, \quad y = \frac{227}{203} (B - A), \quad z = \frac{24}{203} (B - A)$$

Результаты представлены в виде коробчатых диаграмм, представляющих первый, второй и третий квартили, а также максимальное значение и минимальное значение (ФИГ. 14). В результате концентрация полноразмерной молекулы фибронектина составляла 279 ± 131 мкг/мл, что соответствовало известной концентрации FN (300 мкг/мл). Учитывая разницу каждой концентрации, полученной с использованием анти-FN30 моноклонального антитела № 6 и анти-FN44 антитела, концентрация FN24 кДа в плазме была рассчитана как $6,49 \pm 7,44$ мкг/мл.

Пример 12. Терапевтический эффект FN30 на аутоиммунное заболевание

Было проверено, подавляет ли ингибирование FN30 связывание gp49B с фибронектином и оказывает ли терапевтический эффект на продуцирование аутоантитела патогенными плазматическими клетками, следующим образом.

Внутрибрюшинное введение контрольного IgG или FN30-Fc, полученного в

Примере 4, мышам BXSB/Yaa повторяли дважды с интервалом 2 недели. Результаты показаны на Фиг. 15.

Как показано на Фиг. 15, в группе мышей, которым вводили контрольный IgG, титр сывороточных антител против dsDNA IgG постепенно увеличивался, однако в группе, которой вводили FN30-Fc, уровень аутоантител IgG держался относительно постоянным в течение наблюдаемого периода.

Ингибирующий эффект также наблюдался при внутрибрюшинном введении анти-gr49B моноклонального антитела H1.1 мышам BXSB/Yaa при таком же режиме, что и при введении FN30-Fc (Фиг. 16). Подавление увеличения титра аутоантител не оказывало особого влияния на массу селезенки, на общее количество клеток в селезенке, на общее количества клеток костного мозга, на соотношение плазматических клеток в селезенке и в костном мозге, на частоту появления клеток, продуцирующих аутоантитела против dsDNA в селезенке и тому подобного.

Эти результаты свидетельствуют о том, что введение FN30-Fc или анти-gr49B моноклонального антитела H1.1 мышам BXSB/Yaa подавляет дальнейшее увеличение анти-dsDNA IgG без особого устранения антитело-продуцирующих клеток. Из этих результатов можно сделать вывод, что FN-30 и анти-B4 антитело оказывают эффект ослабления аутоиммунного заболевания посредством блокирования связывания между B4 и FN.

Пример 13. Вовлечение LILRB4 в метастазирование рака

Для того чтобы определить, вовлечен или нет LILRB4 (gr49B у мышей) в метастазирование рака, клетки карциномы легкого Льюис (LLC) или клетки мышинной меланомы B16F10 вводили мышам дикого типа (WT) B6 и gr49B-дефицитным мышам через хвостовую вену, и через 30 суток и 20 суток, соответственно, извлекали легкое и печень и выполняли H & E окрашивание или подсчитывали и оценивали число опухолевых узлов на поверхности. Результаты введения LLC показаны на Фиг. 17A - 17D, а результаты ведения B16F10 показаны на Фиг. 18A, 18B и 19.

Как показано на Фиг. 17A и 17B, метастазы LLC в легких были уменьшены у gr49B-дефицитных мышей по сравнению с диким типом. Кроме того, как показано на Фиг. 17C и 17D, область опухолевых метастазов была обнаружена только в печени мышей дикого типа с введенными LLC, и не наблюдались в печени gr49B-дефицитных мышей.

В отношении B16F10, как показано на ФИГ. 18A и 18B, число опухолевых узлов

на общей поверхности легкого значительно уменьшалось у gp49B-дефицитных мышей (ФИГ. 18А), и метастазы в печени были также уменьшены (ФИГ. 18В).

В дальнейшем было выполнено облучение всего тела мышей C57BL/6NJcl при 8,5 Гр, и через 1 сутки клетки костного мозга, полученные из мышей дикого типа или gp49B-дефицитных мышей, были введены и перенесены мышам через хвостовую вену в количестве 5×10^6 клеток/мышь. После адаптивного переноса мышей обрабатывали гентамицином в течение 1 месяца, и через 4 недели после переноса с помощью проточного цитометра было подтверждена общая картина крови для состояния замены донорскими клетками. Результаты показаны на ФИГ. 19. Как показано на ФИГ. 19, метастазов в легких и печени было меньше у мышей, которым адаптивно переносили клетки костного мозга gp49B-дефицитных мышей, чем у контрольных мышей, которым адаптивно переносили клетки костного мозга дикого типа. Из этих результатов видно, что gp49B вовлечен в метастазирование опухолевых клеток.

Пример 14. Ингибирование метастазирования рака посредством ингибирования LILRB4

Как показано в Примере 12, метастазирование опухоли уменьшено в случае дефицита gp49B и, таким образом, было проведено исследование, как на метастазирование опухоли влияет ингибирование gp49B с использованием анти-gp49B моноклонального антитела H1.1, следующим образом.

Мышам B6 с инъекцией B16F10 внутрибрюшинно вводили 6 раз контрольное антитело изотипа IgG, моноклональное антитело против PD-1, моноклональное антитело против gp49B, или комбинацию моноклонального антитела против PD-1 и моноклонального антитела против gp49B. После введения антитела оценивали количество опухолевых узлов в легких и количество метастатических очагов в печени. Результаты показаны на ФИГ. 20А - 20D.

Как показано на ФИГ. 20А - 20D, в группе, обработанной анти-gp49B моноклональным антителом, число метастатических очагов опухоли B16F10 и в легких, и печени уменьшалось таким же образом, как в группе, обработанной анти-PD-1 моноклональным антителом, или в группе, обработанной комбинацией анти-gp49B моноклонального антитела и анти-PD-1 моноклонального антитела. Кроме того, при инъекции LLC, экспрессирующей люциферазу (LLC-Luc2) B6 мышам и исследовании эффекта контрольного антитела изотипа IgG, анти-PD-1 моноклонального антитела, анти-gp49B моноклонального антитела, или комбинации анти-PD-1 моноклонального

антитела и анти-gp49B моноклонального антитела, было показано, что в группе, обработанной анти-gp49B моноклональным антителом, и в группе, обработанной комбинацией анти-PD-1 моноклонального антитела и анти-gp49B моноклонального антитела, число метастатических очагов опухоли LLC-Luc2 уменьшалось как в легких, так и в печени (ФИГ. 20E - 20G).

Кроме того, когда использовали комбинацию анти-PD-1 моноклонального антитела и анти-gp49B моноклонального антитела на мышях, имеющих опухоль LLC-Luc2, число метастатических очагов статистически значительно снижалось (ФИГ. 20G). Ингибирование gp49B подавляло метастазирование LLC-Luc2 в легкие и печень при анализе патологической области таким же образом, как при одновременном ингибировании PD-1 и gp49B (ФИГ. 21). На основании этих результатов показано, что ингибирование LILRB4 подавляет метастазирование рака.

Пример 15. Проверка 1 эффекта стимулирования дифференцировки остеокластов путем ингибирования LILRB4

Клетки костного мозга собирали от мышей дикого типа B6 и культивировали в 48-луночном планшете в количестве $5,0 \times 10^5$ клеток/лунка с использованием среды α -MEM, содержащей 10% FCS и 10 мкг/мл антитела контрольного изотипа IgG, анти-gp49B моноклонального антитела H1.1, F(ab')₂-фрагмента анти-gp49B моноклонального антитела H1.1 или анти-FN30 моноклонального антитела № 6. Через 2 часа культивирования, добавляли M-CSF в количестве 20 нг/лунка, и культивирование дополнительно проводили в течение 48 часов. С этого момента времени для того, чтобы индуцировать дифференцировку в остеокласты, добавляли α -MEM с добавкой 10% FCS, содержащую 20 нг/мл M-CSF и 100 нг/мл RANKL и через 6 суток выполняли окрашивание TRAP. Результаты показаны на ФИГ. 22.

Как показано на ФИГ. 22, в отношении индукции дифференцировки в остеокласты, в результате добавления анти-gp49B моноклонального антитела H1.1 или F(ab')₂-фрагмента анти-gp49B моноклонального антитела H1.1, индукция уровня дифференцировки (%) (число остеокластов/общее число клеток \times 100) составляла 3,5% и 3,4% соответственно, и незначительное увеличение наблюдалось по сравнению со случаем контрольного антитела изотипа IgG (2,7%). Кроме того, уровень индукции дифференцировки составлял 7,9% при добавлении анти-FN30 моноклонального антитела № 6, и наблюдалось существенное увеличение.

Пример 16. Проверка 2 эффекта стимулирования дифференцировки остеокластов

путём ингибирования LILRB4

CD11b-положительные моноциты были получены из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученной из образца крови, собранной из здорового субъекта, с использованием магнитного клеточного сортера MACS (производство Miltenyi Biotec К.К.). Моноциты культивировали в течение 7 суток в среде α -MED с добавлением 10% FCS, содержащей 100 нг/мл RANKL и 25 нг/мл M-CSF при добавлении анти-LILRB4 моноклонального антитела ZM4.1 (производство Thermo Fisher Scientific, Inc.) в количестве 1,0 мкг/мл или мышиного IgG1к (производство BioLegend) в количестве 1,0 мкг/мл в качестве антитела изотопического контроля, с последующим окрашиванием TRAP. Результаты показаны на ФИГ. 23.

Как показано на ФИГ. 23, индукция уровня дифференцировки из PBMC в остеокласты составляла 13,7%, и по сравнению со случаем антитела изотипического контроля (7,6%), индукция дифференцировки в остеокласты была увеличена примерно в два раза при добавлении анти-LILRB4 антитела.

Пример 17. Проверка 3 эффекта стимулирования дифференцировки остеокластов путем ингибирования LILRB4

Клетки костного мозга собирали от мышей дикого типа B6 и gp49B-дефицитных мышей и культивировали в 24-луночной планшете в течение 2 суток с использованием среды α -MEM, содержащей 10% FCS, 20 нг/мл M-CSF и $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. После этого для индукции дифференцировки в остеокласты добавляли среду α -MEM с добавлением 10% FCS, содержащую M-CSF в количестве 20 нг/луночка и RANKL в количестве 100 нг/мл, и через 5 суток выполняли окрашивание TRAP. Результаты показаны на ФИГ. 24.

Как показано на ФИГ. 24, индукция уровня дифференцировки в остеокласты увеличивается приблизительно в 3 раза в клетках костного мозга, полученных от gp49B-дефицитных мышей, по сравнению с клетками костного мозга, полученными из мышей дикого типа.

Пример 18. Проверка 4 эффекта стимуляции дифференцировки остеокластов путем ингибирования LILRB4

Бедренные кости были выделены из мышей B6 дикого типа (самок) в возрасте 18 недель и gp49B-дефицитных мышей (самок) в возрасте 18 недель и зафиксированы в соответствии с методом Kawamoto ("Technique for Preparation of Thin Frozen Sections from Undecalcified Hard Tissues (Kawamoto's method 2008) and its Application", Tadafumi Kawamoto, "Pathological Technology, vol. 72, № 2, pp. 76-83, 2009"), и затем готовили

замороженный срез с последующим окрашиванием TRAP, благодаря чему были обнаружены остеокласты. Результаты показаны на ФИГ. 25.

Как показано на ФИГ. 25, больше остеокластов было обнаружено у gp49B-дефицитных мышей, чем у мышей B6 дикого типа.

Промышленная применимость

В соответствии с настоящим изобретением могут быть предложены ингибитор иммунных контрольных точек, терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, иммуносупрессор, антитело против фибронектина или его производное, аналог фибронектина, набор для определения фибронектина или его неполного белка и способ определения фибронектина или его неполного белка.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор иммунных контрольных точек, содержащий в качестве активного ингредиента вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4.

2. Ингибитор иммунных контрольных точек по п. 1, где фибронектин связывается с иммуносупрессивным рецептором LILRB4 с помощью аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине.

3. Ингибитор иммунных контрольных точек по п. 1 или 2, где вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4, представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, или аналог фибронектина.

4. Ингибитор иммунных контрольных точек по п. 3, где антитело против фибронектина или его производное связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине.

5. Ингибитор иммунных контрольных точек по п. 3, где аналог фибронектина представляет собой любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой от одной до нескольких аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

6. Терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, содержащий в качестве активного ингредиента вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4.

7. Терапевтический агент по п. 6, где фибронектин связывается с иммуносупрессивным рецептором LILRB4 с помощью аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине.

8. Терапевтический агент по п. 6 или 7, где вещество, которое ингибирует связывание фибронектина с иммуносупрессивным рецептором LILRB4, представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, или аналог фибронектина.

9. Терапевтический агент по п. 8, где антитело против фибронектина или его производное связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, в фибронектине.

10. Терапевтический агент по п. 8, где аналог фибронектина представляет собой любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой от одной до нескольких аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

11. Терапевтический агент по любому из пп. 6 - 10, где заболевание, связанное с иммунными контрольными точками, выбрано из группы, состоящей из аутоиммунного заболевания, рака, воспалительного заболевания и аллергического заболевания.

12. Терапевтический агент по п. 11, где рак обусловлен метастазами рака.

13. Терапевтический агент для заболевания, связанного с иммунными контрольными точками, содержащий в качестве активного ингредиента вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4.

14. Терапевтический агент по п. 13, где вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4, представляет собой антитело против

фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, или фибронектин или аналог фибронектина.

15. Терапевтический агент по п. 14, где аналог фибронектина представляет собой любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой от одной до нескольких аминокислот были удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

16. Терапевтический агент по любому из пп. 13 - 15, где заболевание, связанное с иммунными контрольными точками, представляет собой заболевание костей.

17. Иммуносупрессор, содержащий в качестве активного ингредиента вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4.

18. Иммуносупрессор по п. 17, где вещество, которое активирует иммуносупрессивный рецептор LILRB4, представляет собой антитело против фибронектина или его производное, антитело против иммуносупрессивного рецептора LILRB4 или его производное, или фибронектин или аналог фибронектина.

19. Иммуносупрессор по п. 18, где аналог фибронектина представляет собой любой из следующих пептидов (а) - (в):

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой от одной до нескольких аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую

идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

20. Антитело против фибронектина или его производное, которое связывается с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1.

21. Аналог фибронектина, в котором любой из следующих пептидов (а) - (в) и Fc-фрагмент иммуноглобулина G слиты друг с другом:

(а) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1;

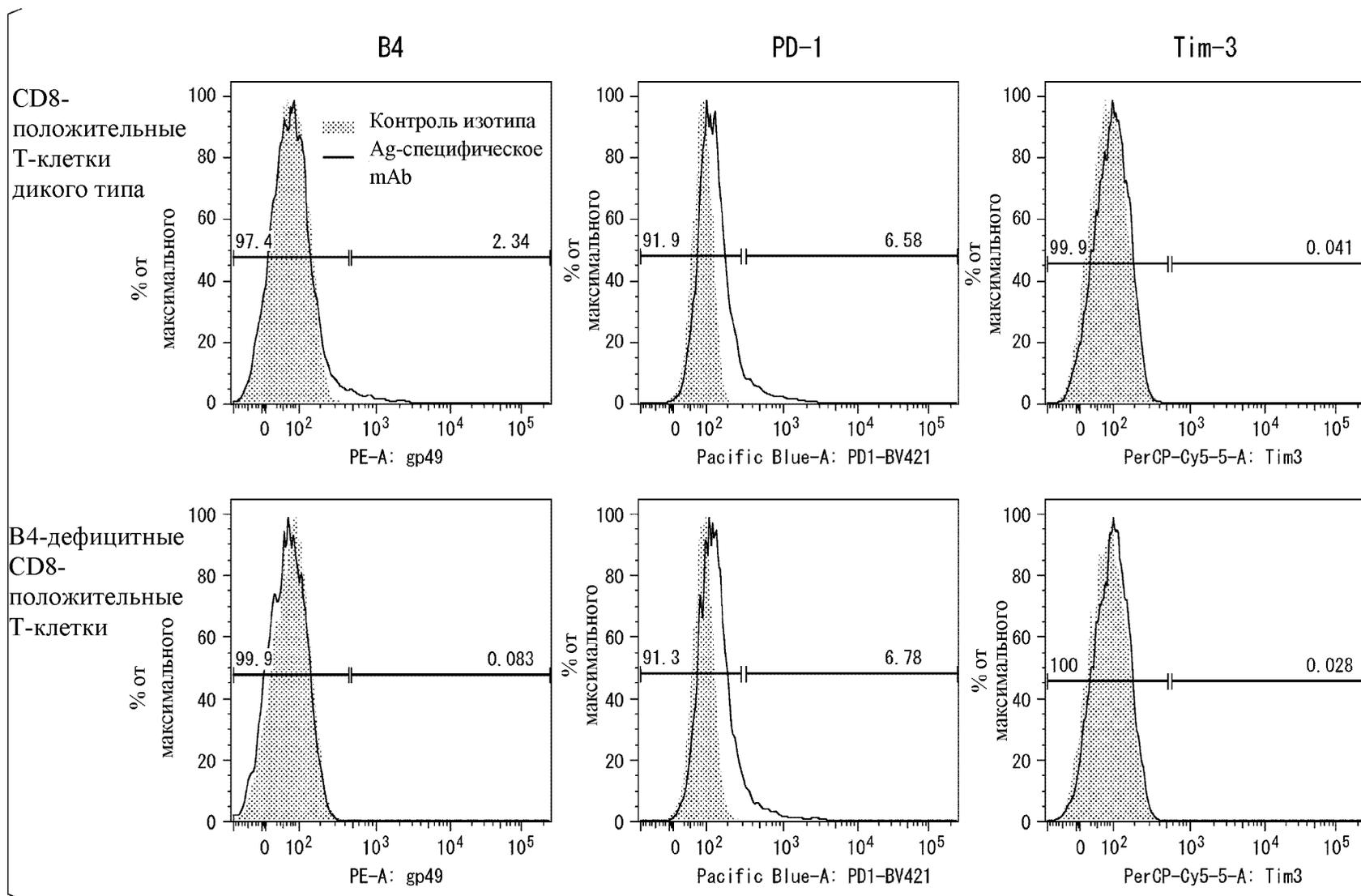
(б) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой от одной до нескольких аминокислот удалены, вставлены, замещены или добавлены в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4; и

(в) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, и обладающий способностью связываться с фибронектин-связывающим сайтом иммуносупрессивного рецептора LILRB4.

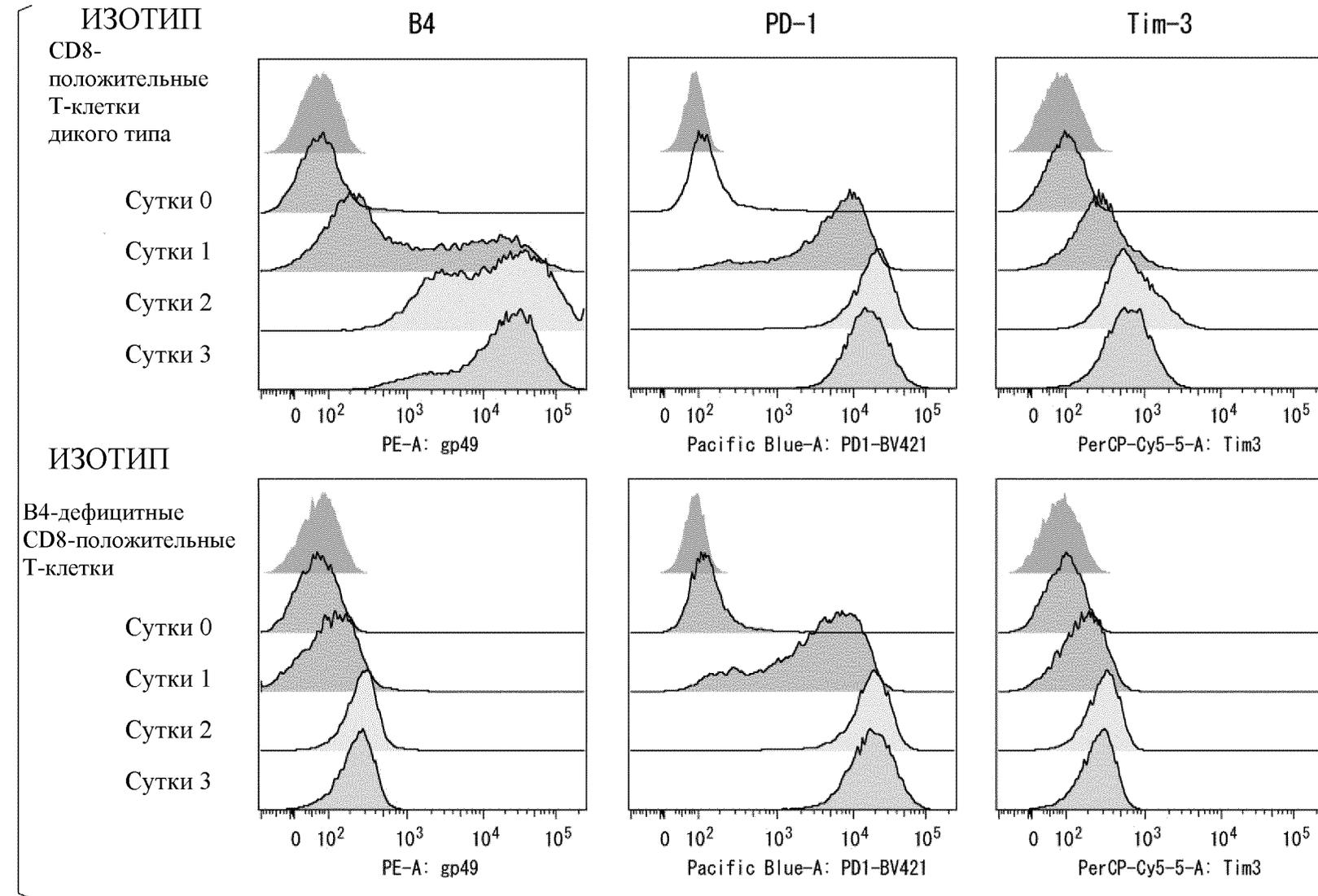
22. Набор для определения фибронектина, содержащего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, или его неполного белка, содержащихся в биологическом образце, содержащий антитело против фибронектина или его производное по п. 20.

23. Способ определения фибронектина или его неполного белка в биологическом образце с использованием набора по п. 22.

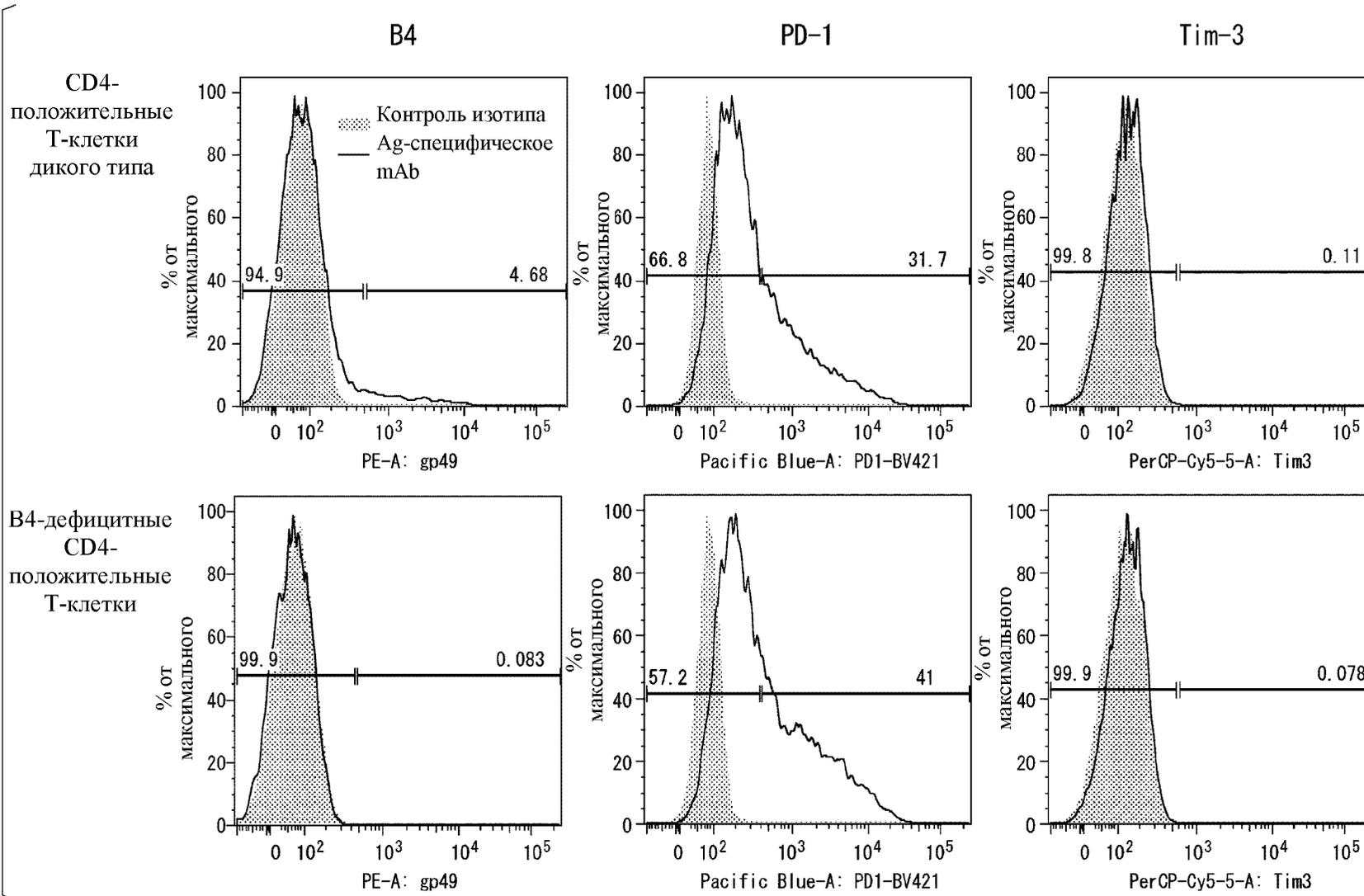
Фиг. 1



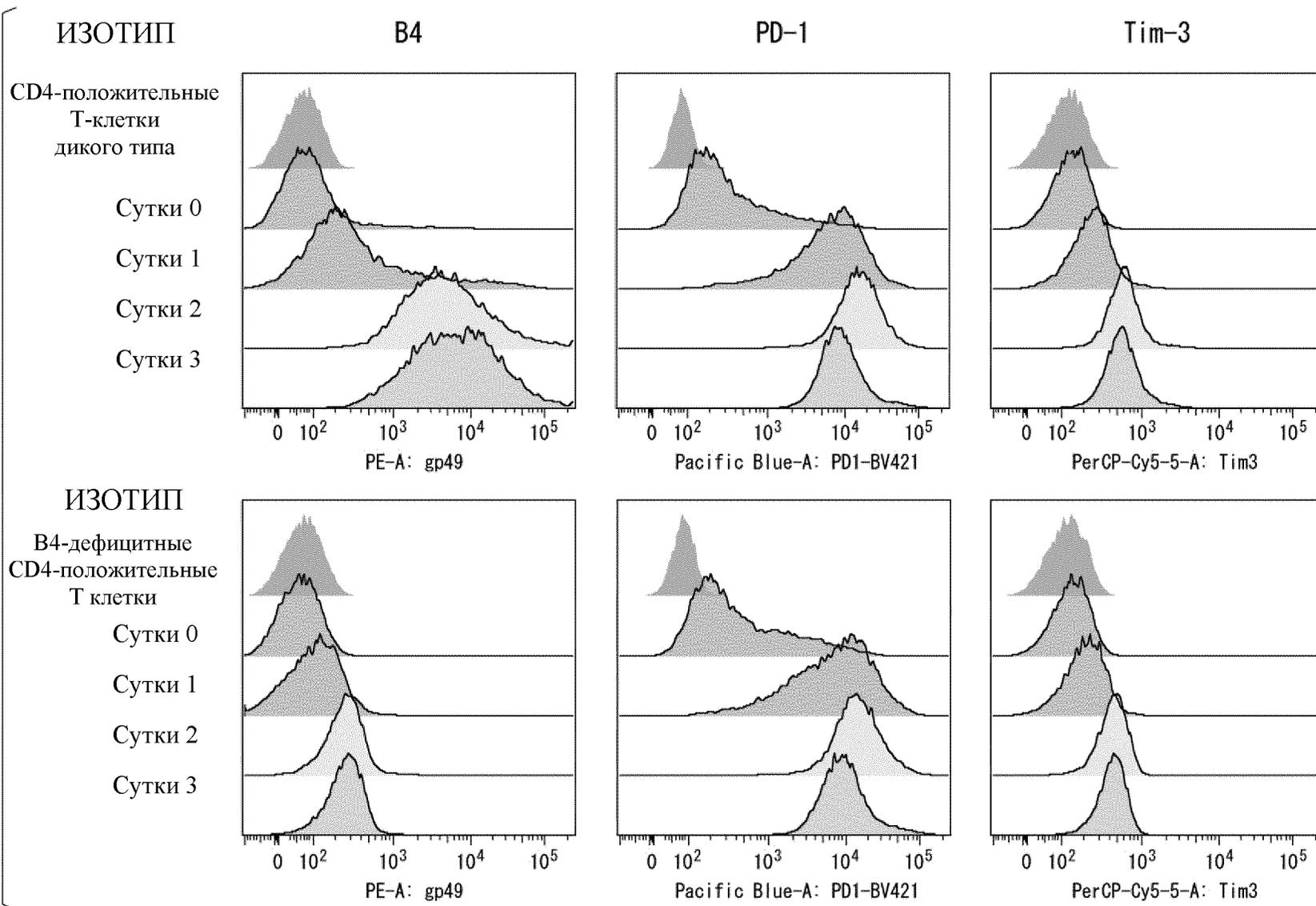
Фиг. 2



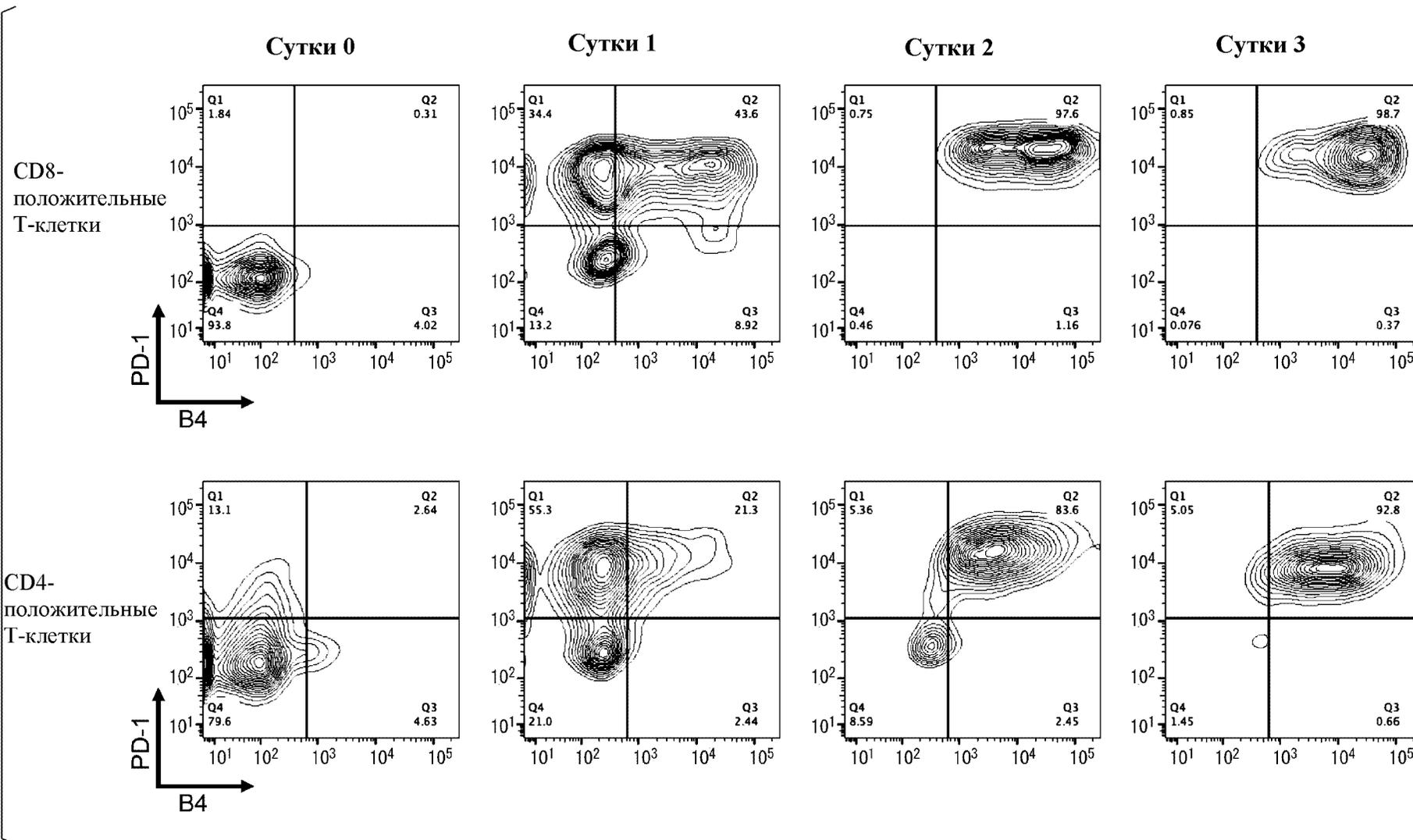
Фиг. 3



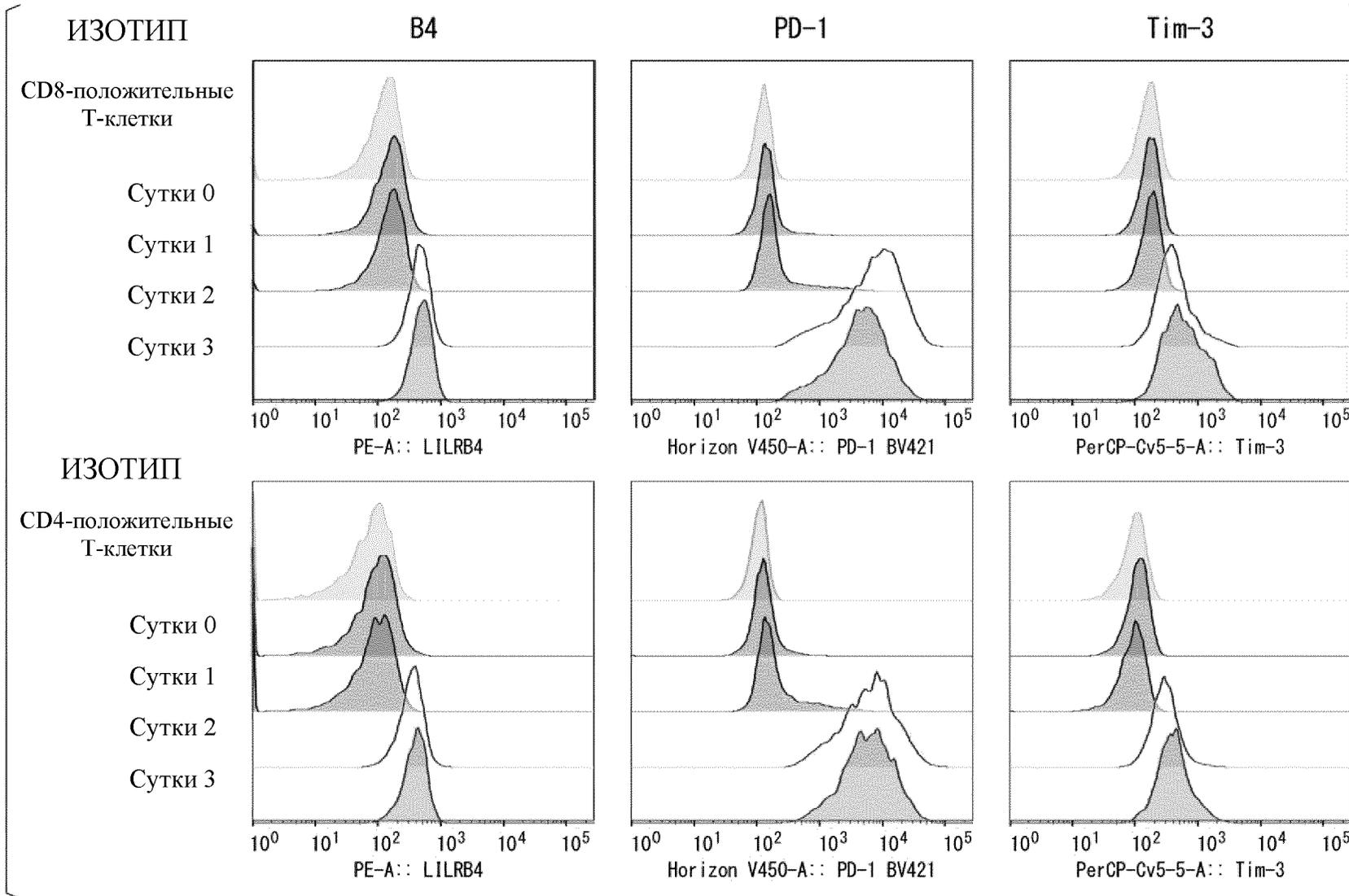
Фиг. 4



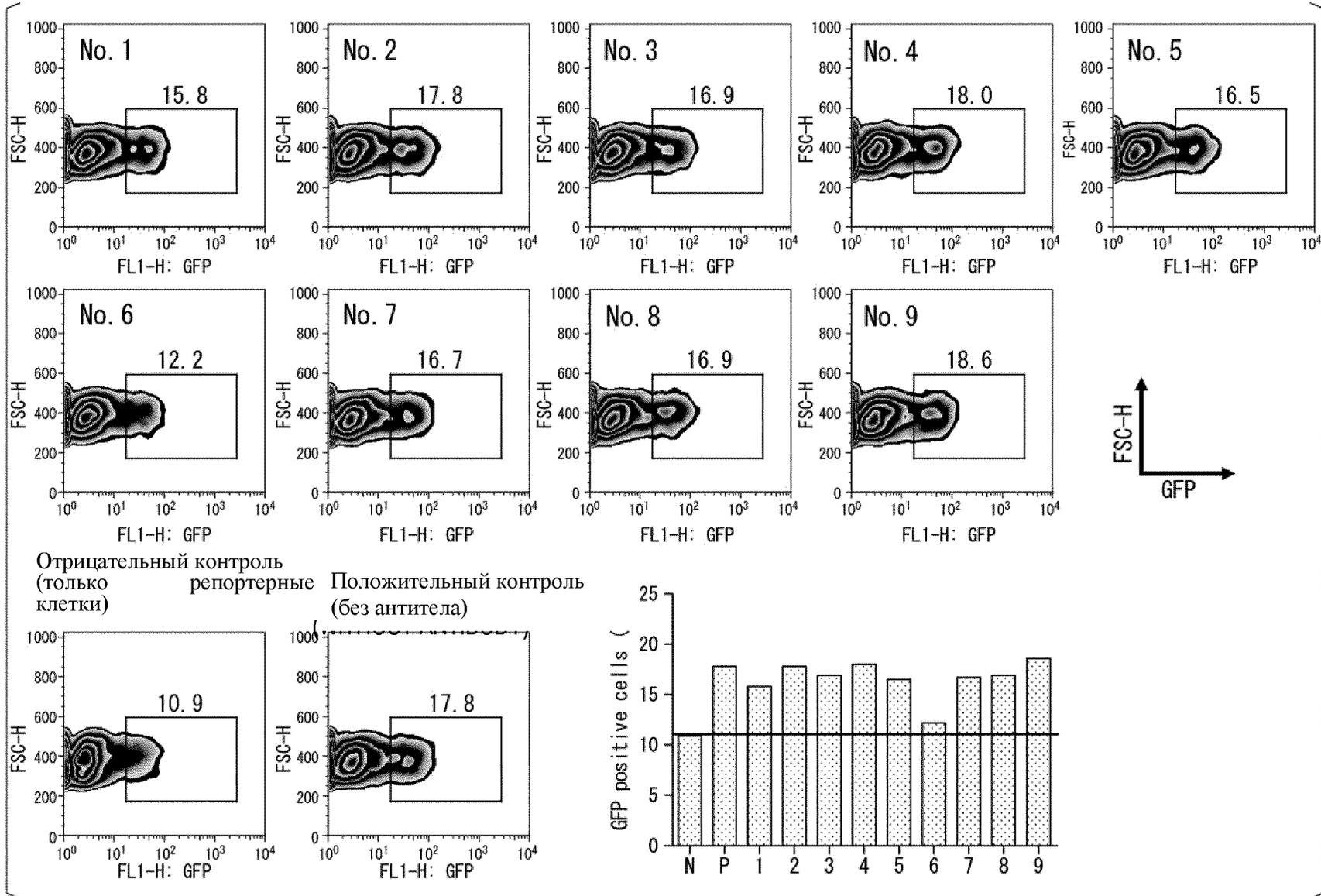
Фиг.5



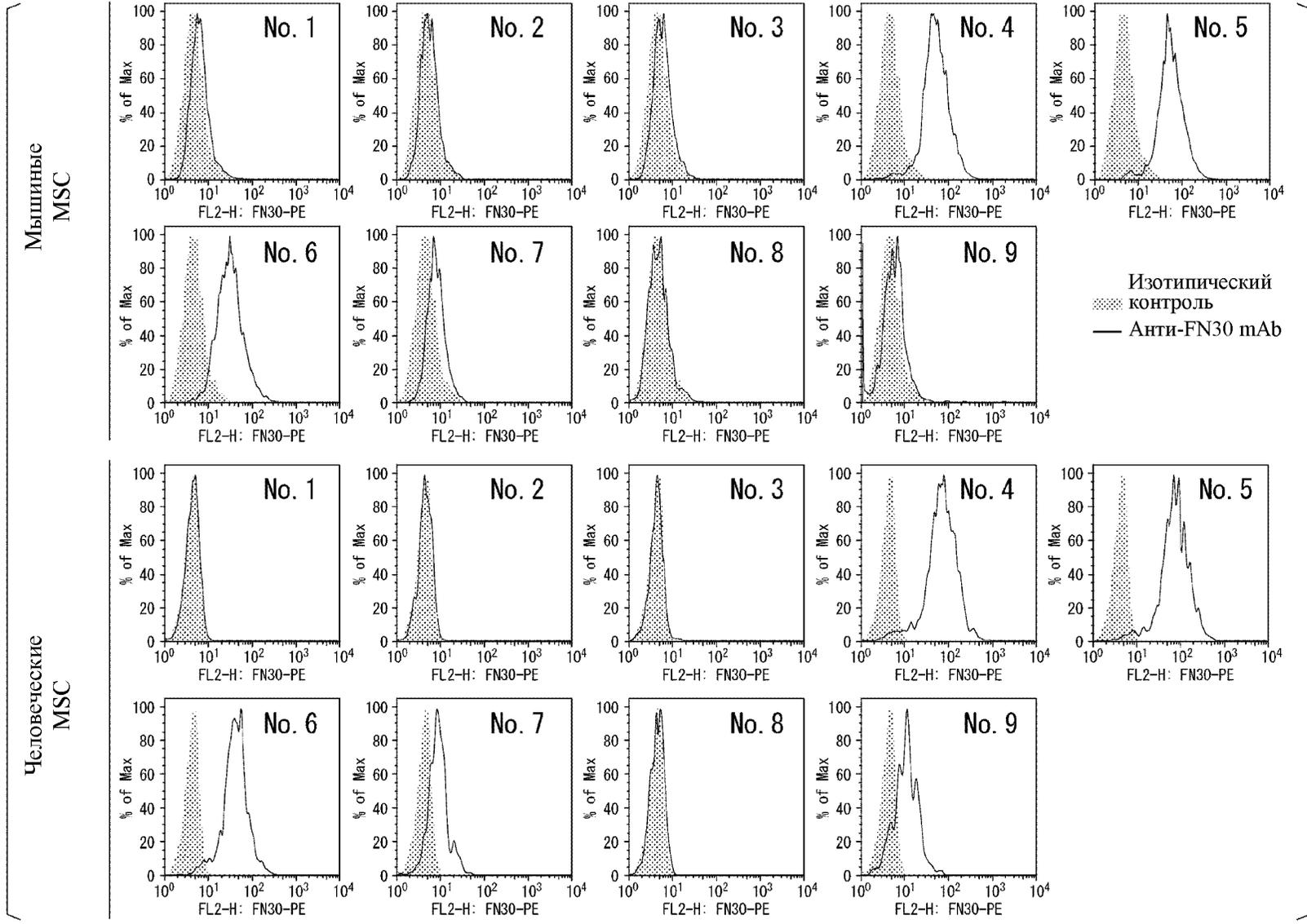
Фиг. 6



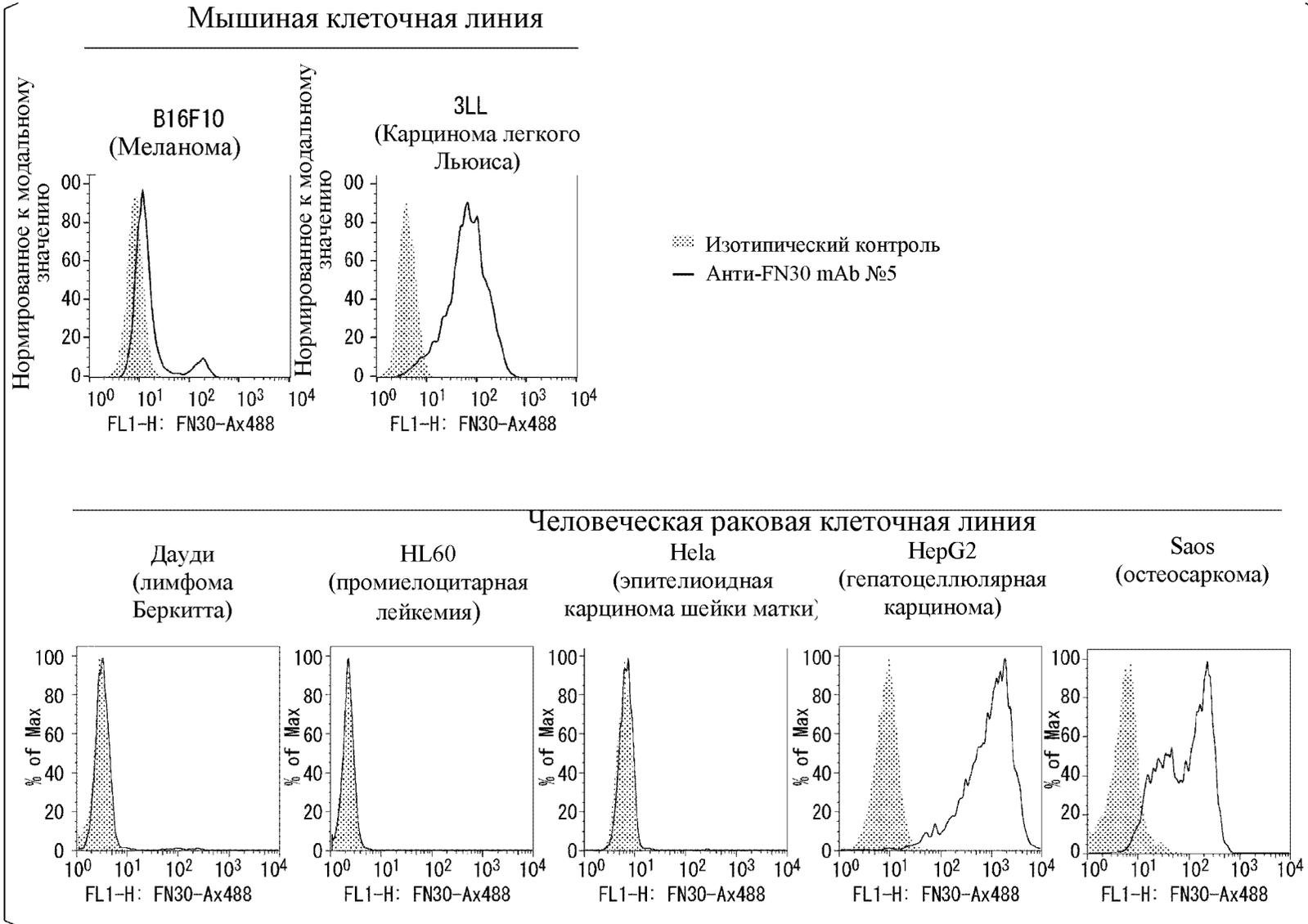
Фиг. 7



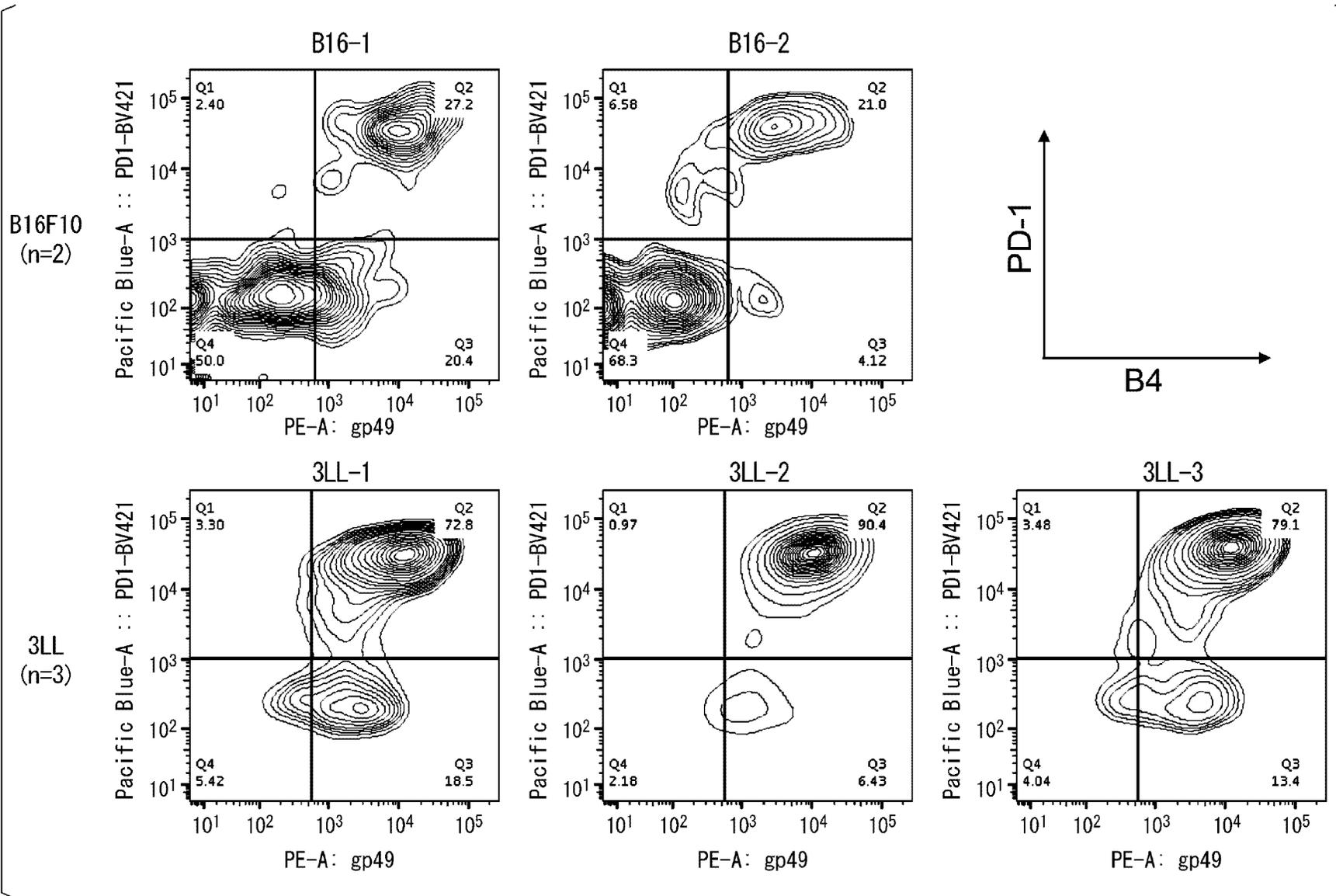
Фиг. 8



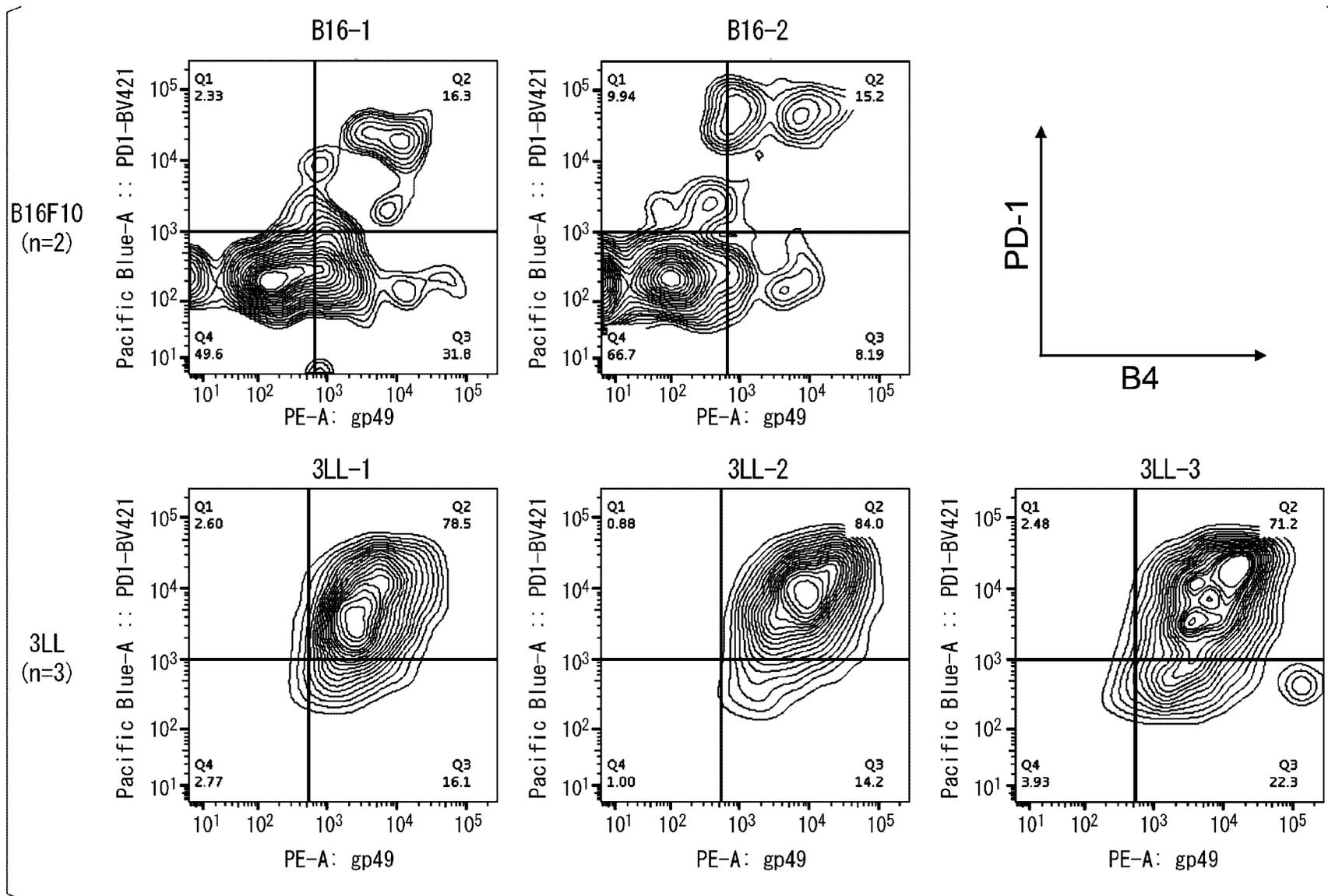
Фиг. 9



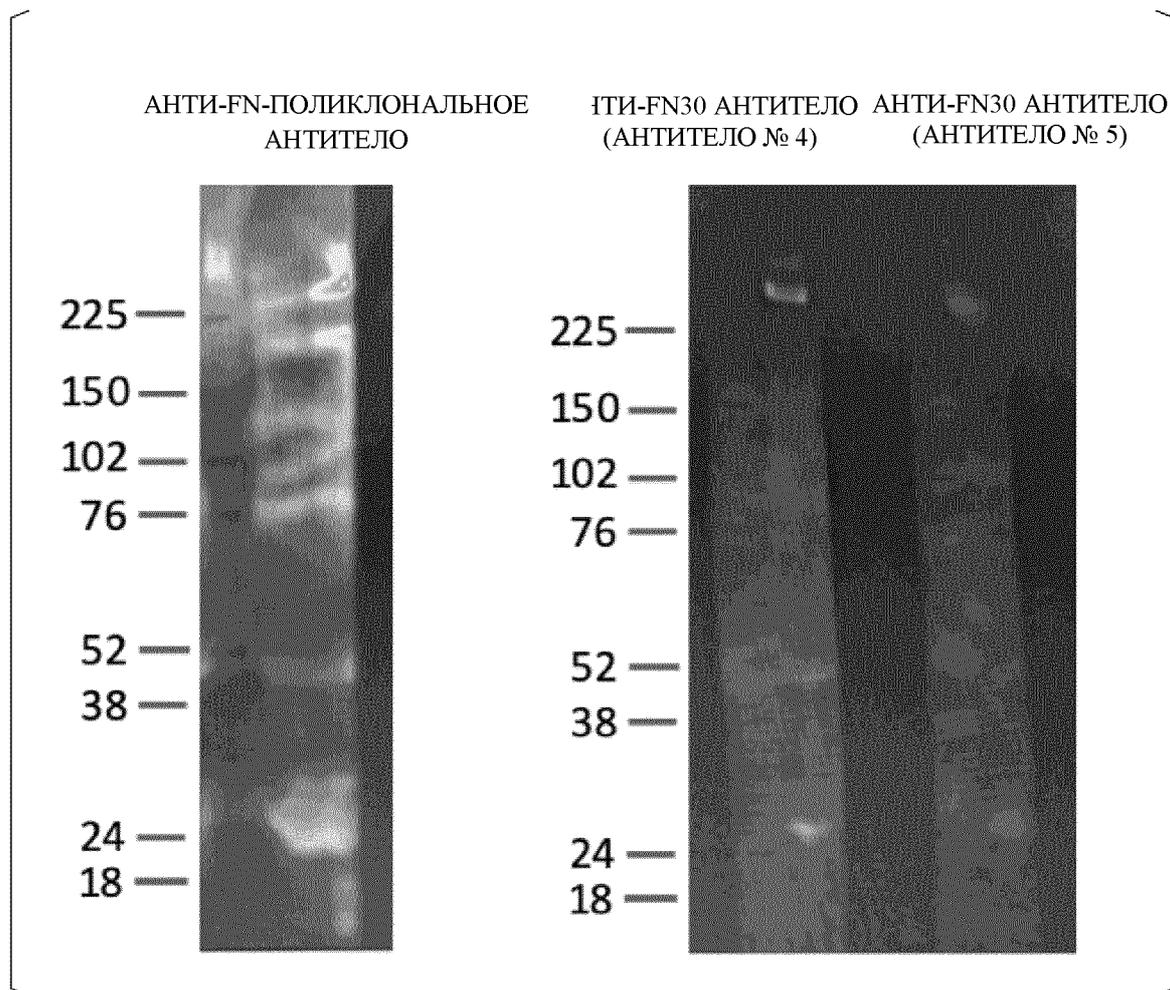
Фиг. 10



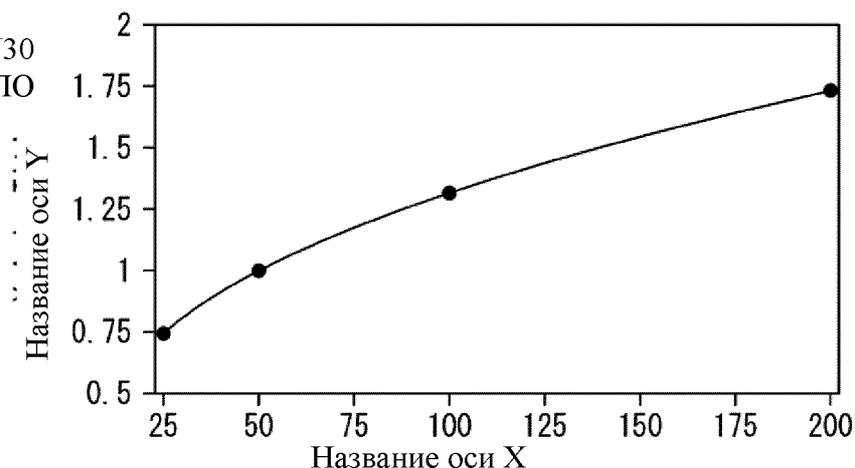
Фиг. 11



Фиг. 12

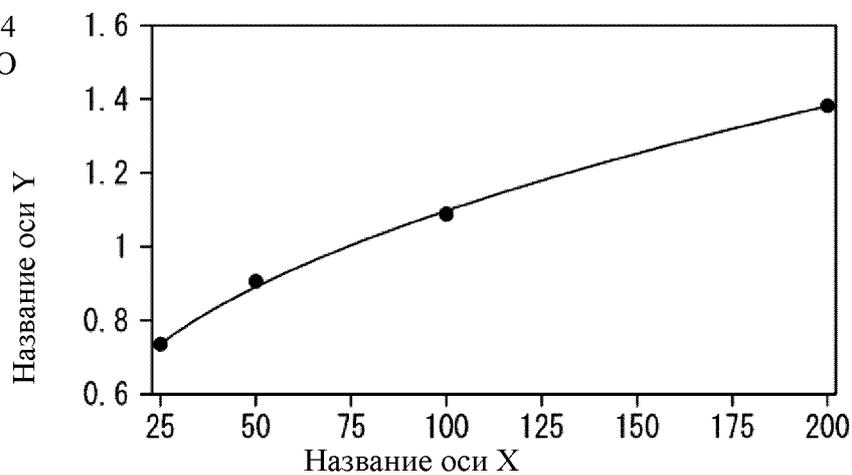


Фиг. 13

АНТИ-FN30
АНТИТЕЛО

$$y=537.8014+(-0.09311525-537.8014)/(1+(x/801216300)^{0.3740341})$$

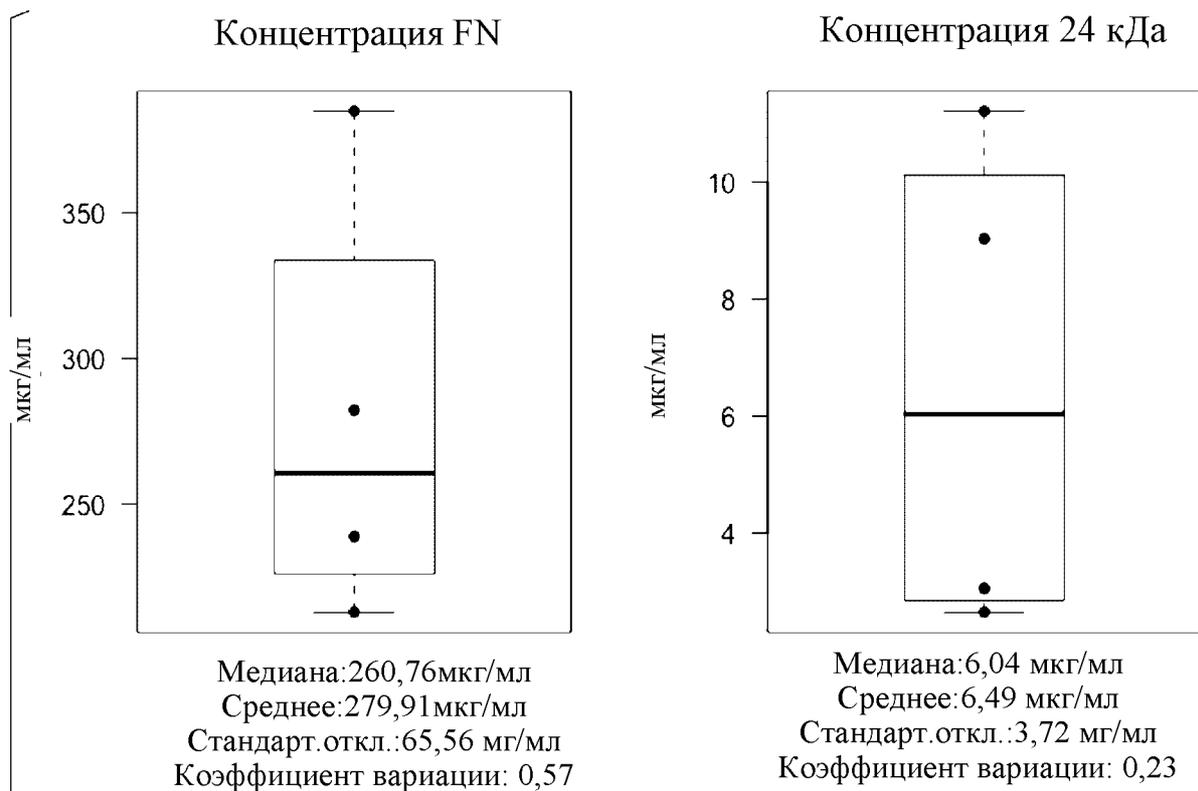
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
A	270.44	401.28	228.8	237.2
	300.52	374.08	219.78	259.06
Среднее	285.48	387.68	224.29	248.13

АНТИ-FN44
АНТИТЕЛО

$$y=873.7667+(0.3501713-873.7667)/(1+(x/331162100)^{0.4707933})$$

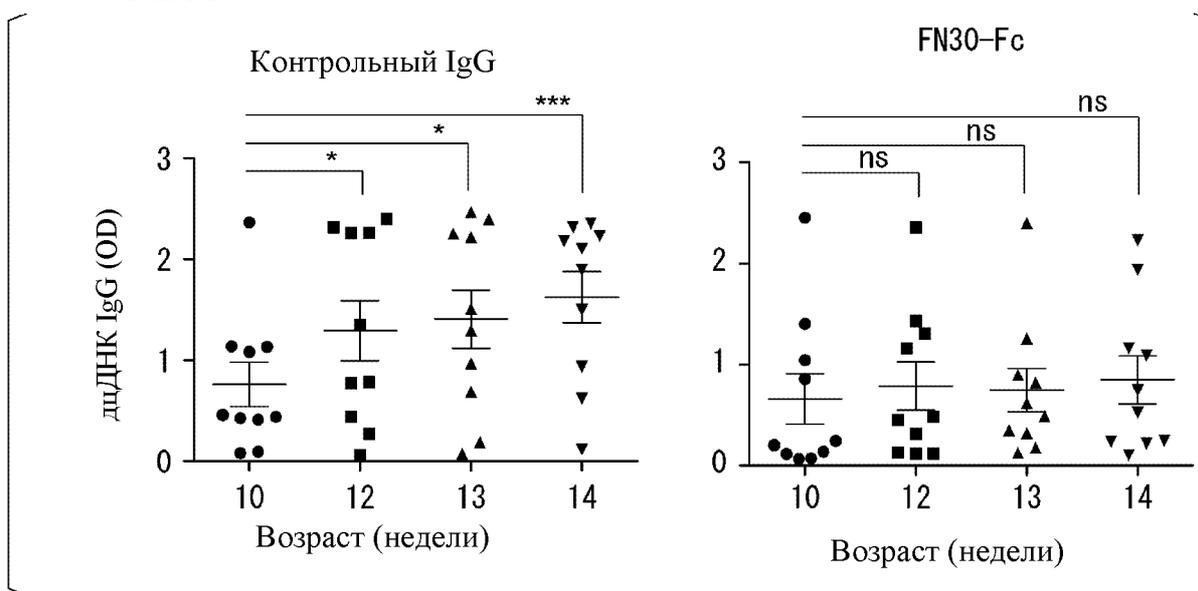
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
B	351.72	448.8	260.46	321.48
	270.8	371.24	377.88	327.6
Среднее	311.26	410.02	319.17	324.54

Фиг. 14

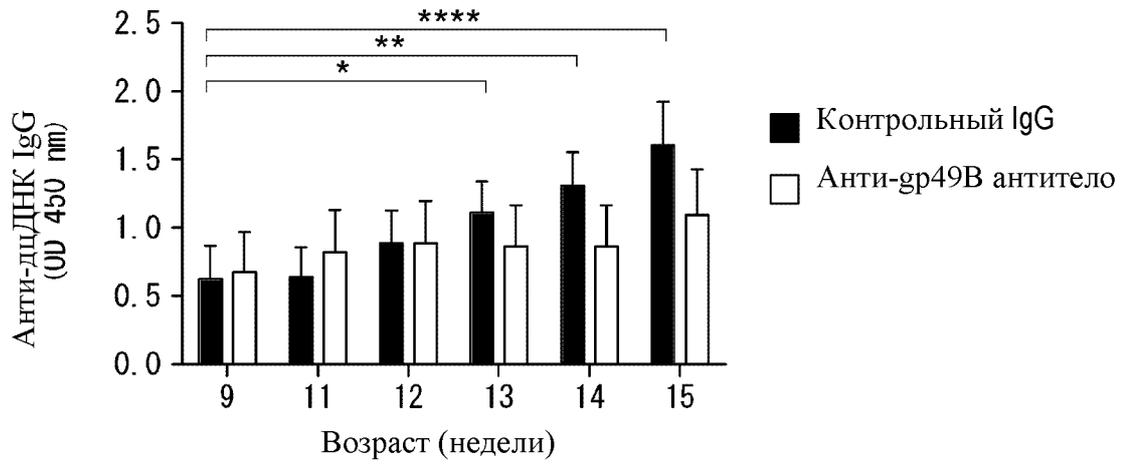


(Коробчатая диаграмма, представляющая первый, второй и третий квантили)

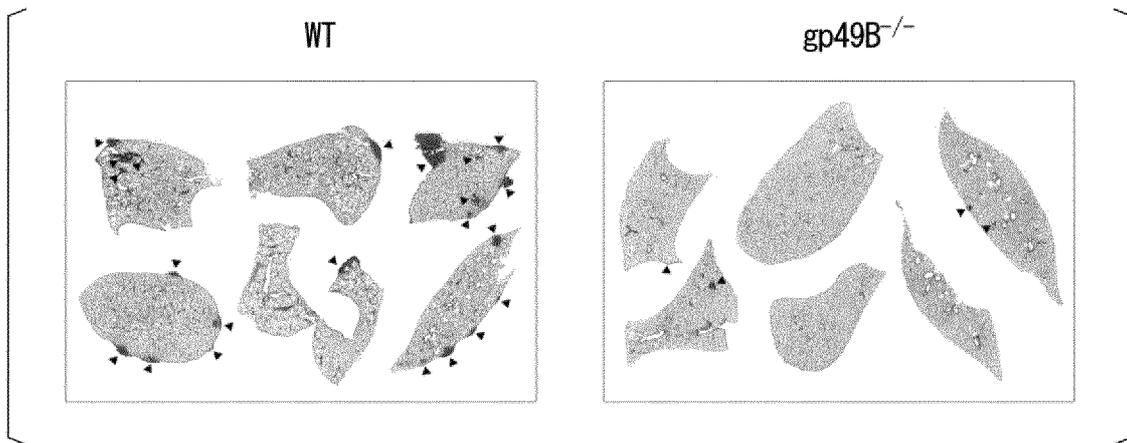
Фиг. 15



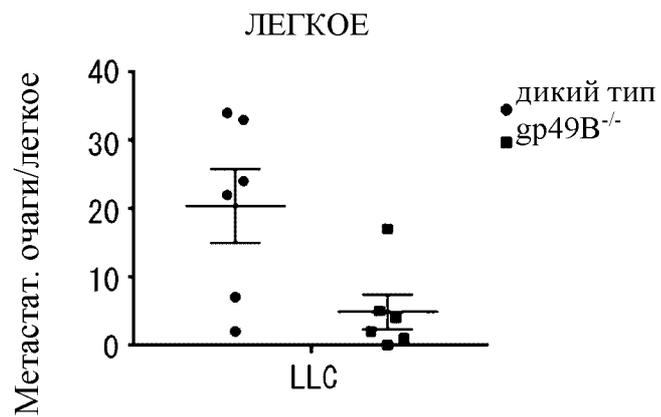
Фиг. 16



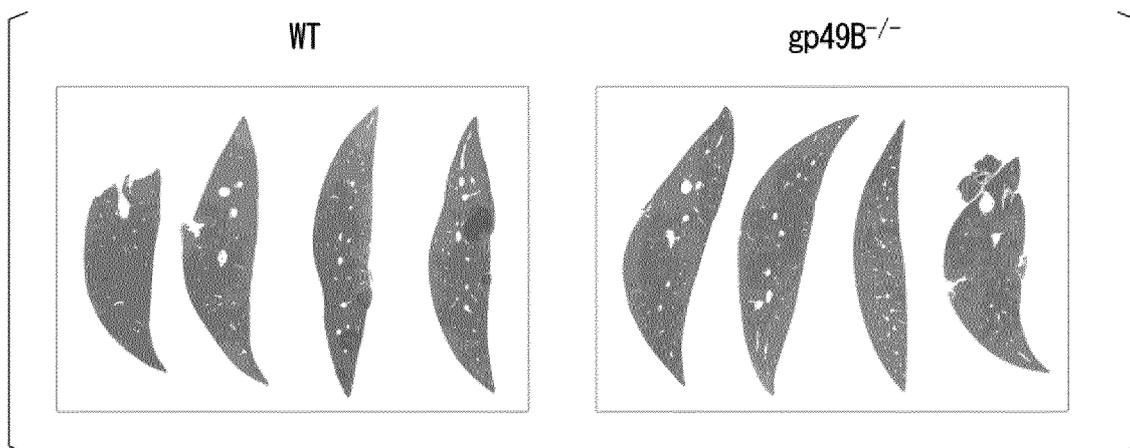
Фиг. 17А



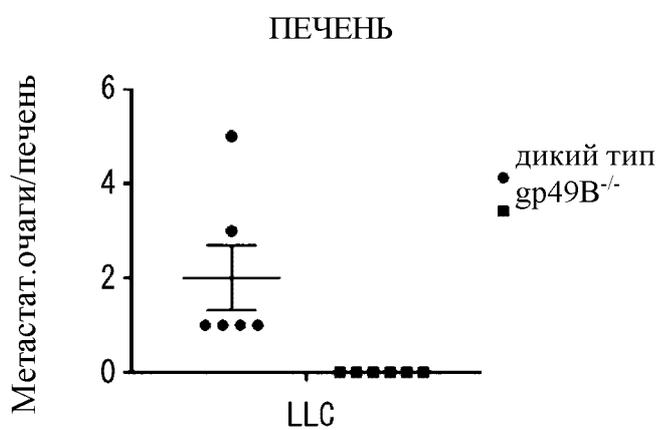
Фиг. 17В



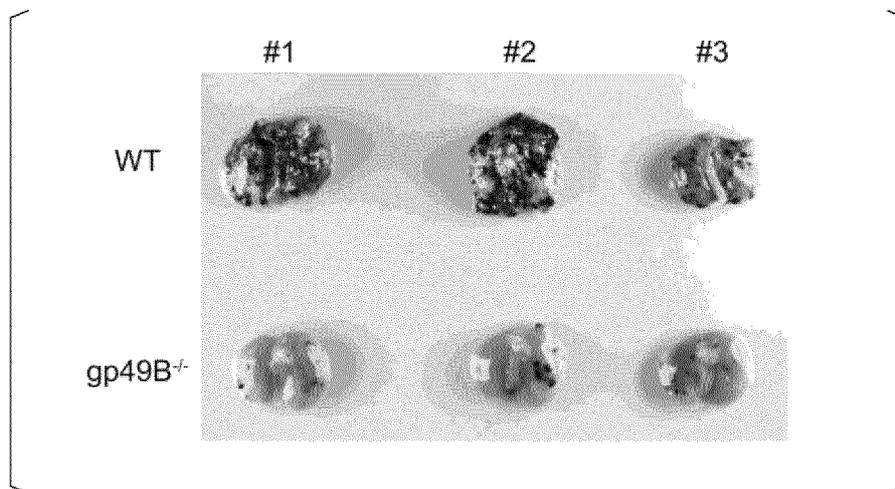
Фиг. 17С



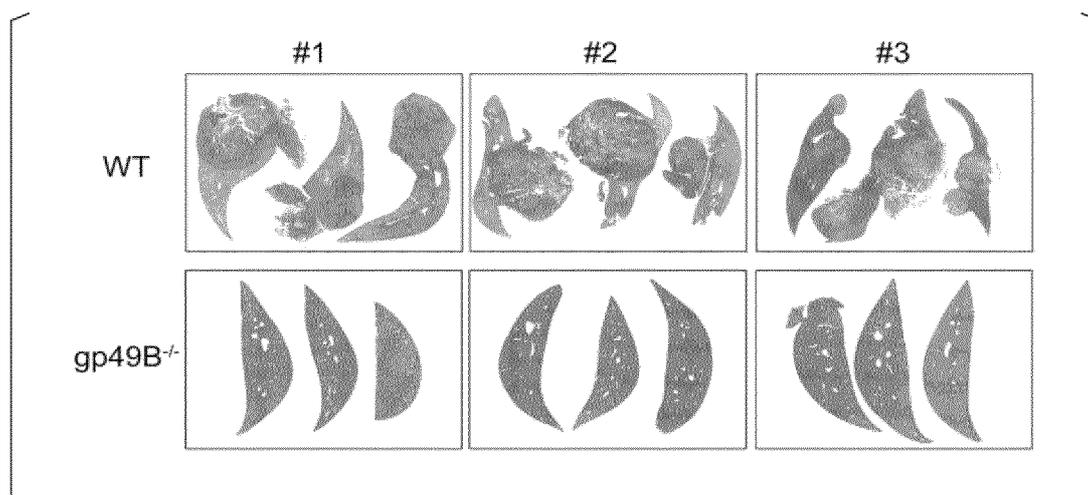
Фиг. 17D



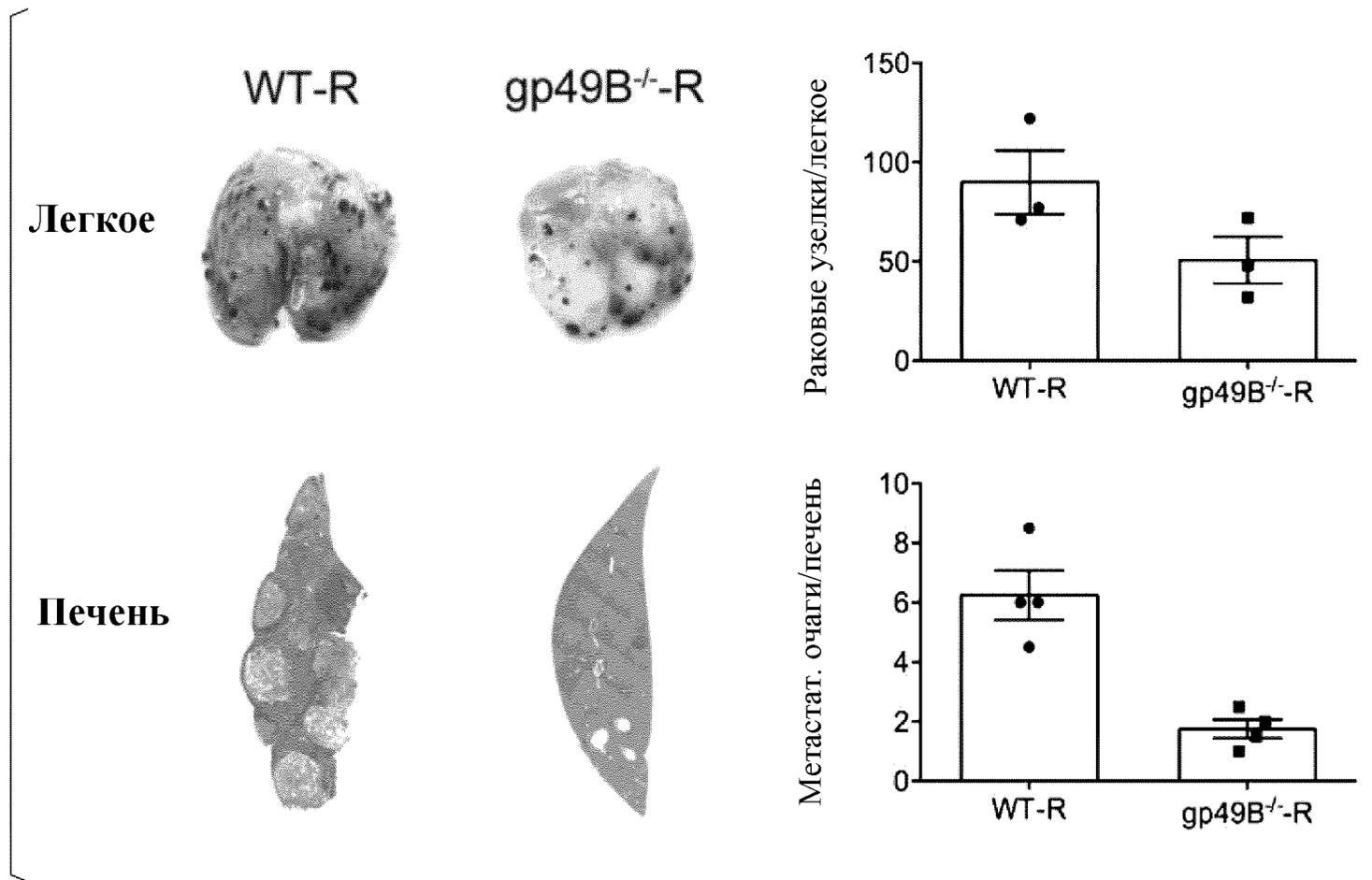
Фиг. 18А



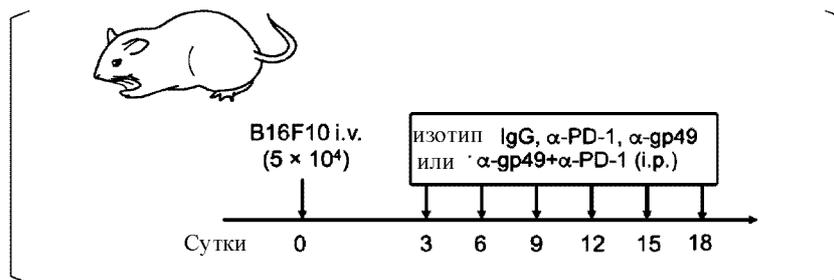
Фиг.18 В



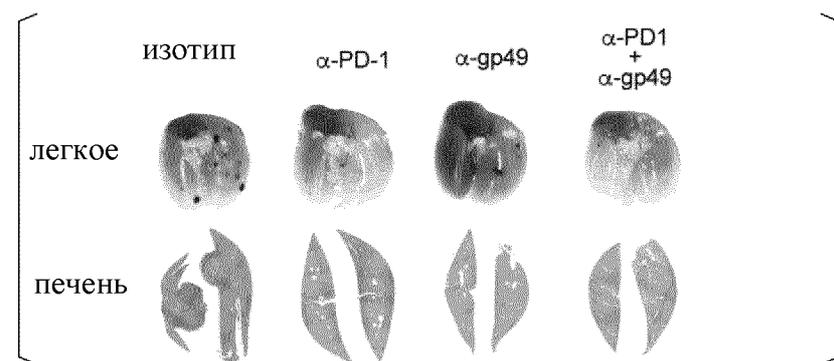
Фиг. 19



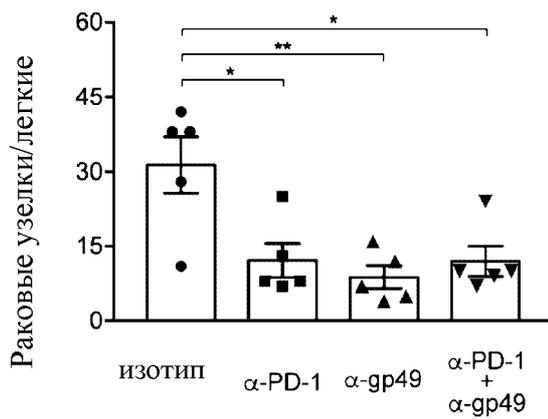
Фиг. 20А



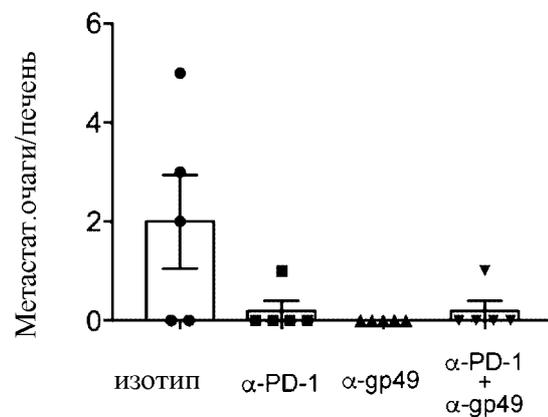
Фиг. 20В



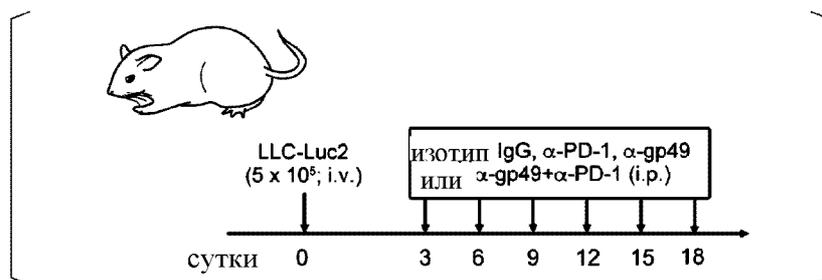
Фиг. 20С



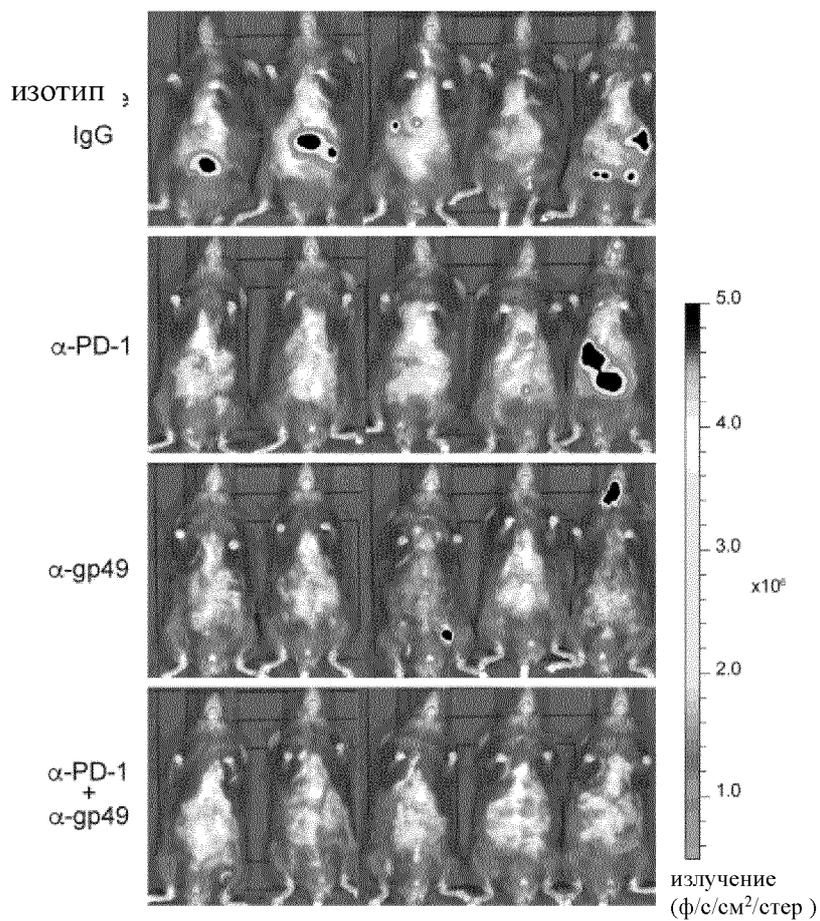
Фиг. 20D



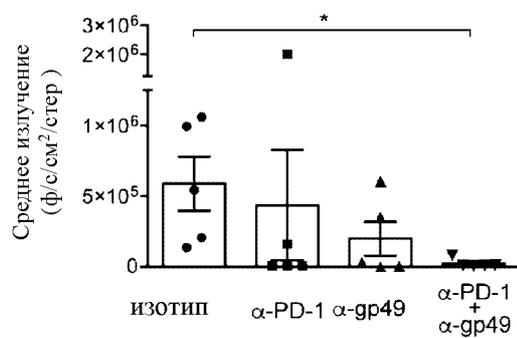
Фиг. 20E



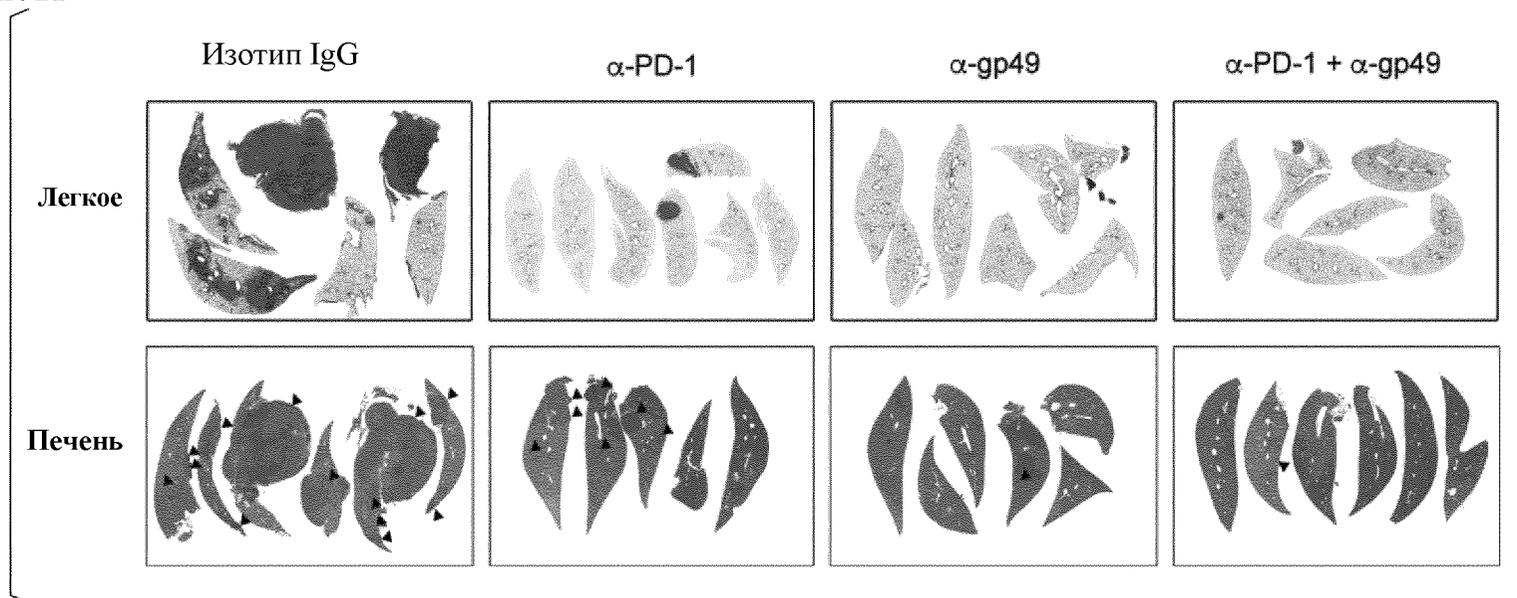
Фиг. 20F



Фиг. 20G

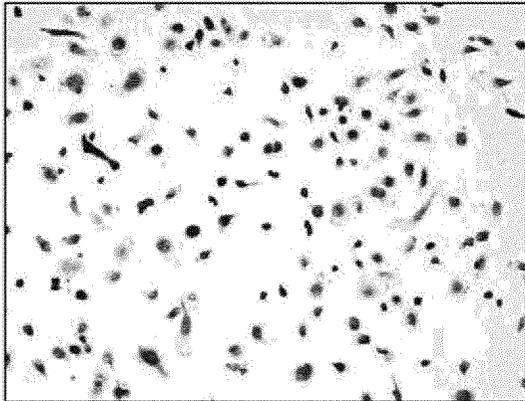


Фиг. 21

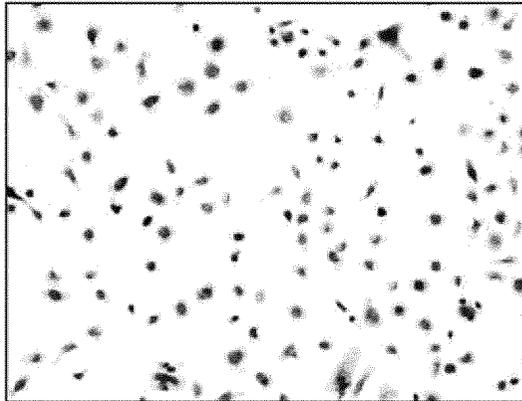


Фиг. 22

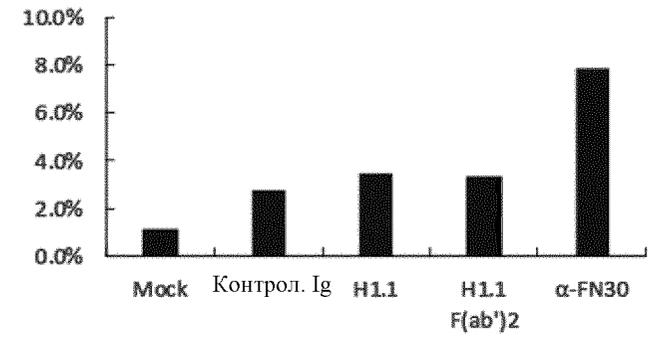
Mock 1.1%



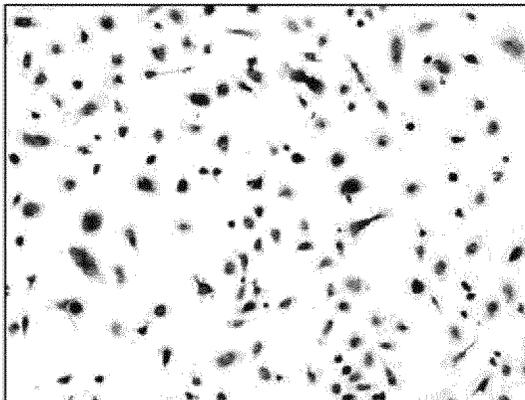
Хомяк IgG2a 2.7%



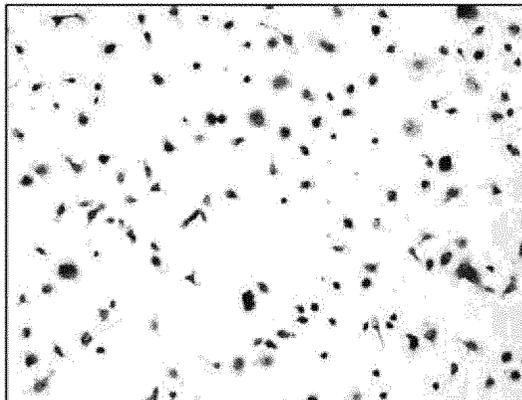
Уровень дифференцировки(%)



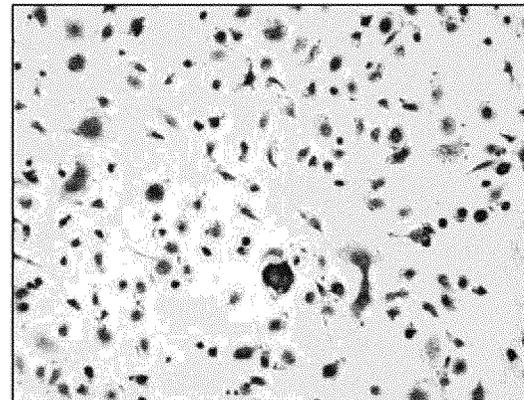
H1.1 3.5%



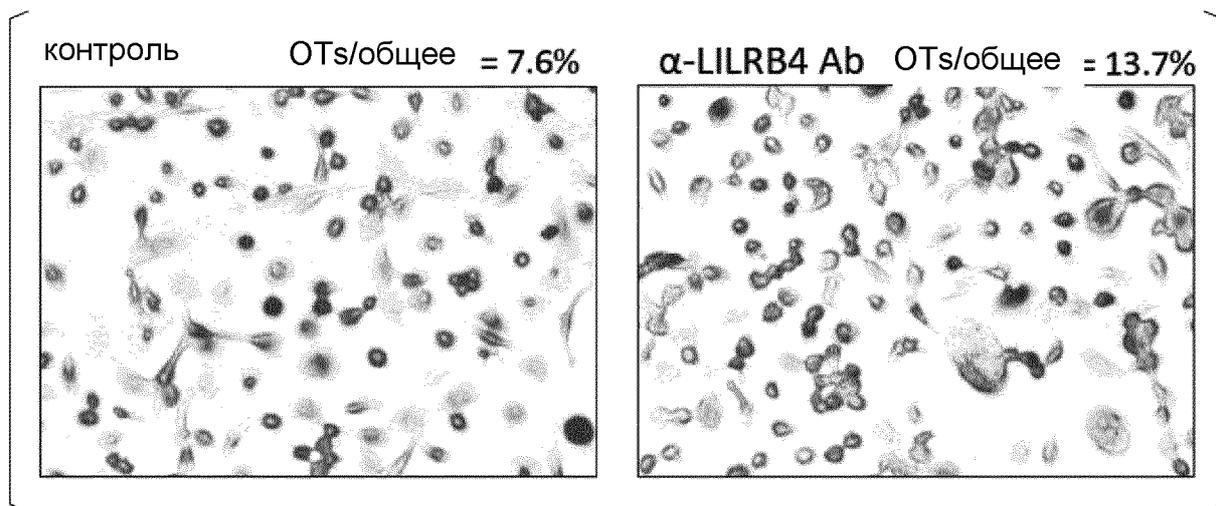
H1.1 F(ab')₂ 3.4%



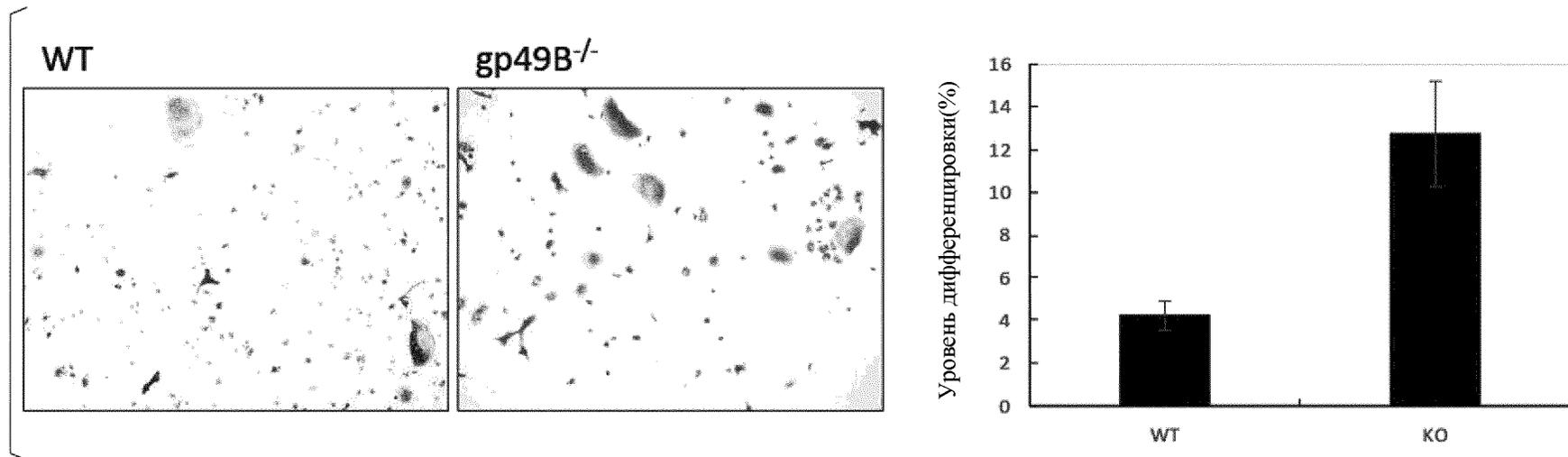
α-FN30 7.9%



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

WT

♀ Рождение 9/12~14 (18 недель)

**gp49B -/-**

♀ Рождение 9/12 (18 недель)

