

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291105** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.07.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.09

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ХЕМОКИН-ПОДОБНОГО
РЕЦЕПТОРА 1 И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 19306322.9; 19306323.7

(32) 2019.10.09

(33) EP

(86) PCT/EP2020/078488

(87) WO 2021/069709 2021.04.15

(71) Заявитель:
**ОЗЕ ИММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС
(FR)**

(72) Изобретатель:

**Готье Ванесса, Пуарье Никола, Мари
Каролин, Трильо Шарлен (FR)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к гуманизированным анти-СМКLR1 соединениям, обладающим агонистической способностью при взаимодействии между резолвином E1 и СМКLR1, и их применениям при лечении или профилактике заболевания, в частности при замедлении или нарушении разрешения воспаления.

202291105

A1

A1

202291105

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ХЕМОКИН-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 1 И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области иммунотерапии. Настоящее изобретение относится к новым гуманизированным антителам против рецептора хемерина, которые обладают резолвин-E1-подобной агонистической активностью в отношении хемокин-подобного рецептора-1 (CMKLR1). Настоящее изобретение также относится к применению такого антитела в терапии, в частности, для лечения аутоиммунных заболеваний и хронических воспалительных заболеваний, инфекционных заболеваний, онкологических заболеваний и любого состояния, при котором фаза разрешения воспаления нарушена или замедлена.

Предшествующий уровень техники

Критическая роль воспалительных процессов в здоровье и заболеваниях давно признана. Детальные молекулярные механизмы и биологические события, которые регулируют прогрессирование и разрешение воспаления, по-прежнему представляют критический интерес. Недавние исследования предоставили убедительные доказательства того, что разрешение воспаления не является пассивным процессом, как считалось ранее. Разрешение воспаления представляет собой биосинтетически активный процесс, регулируемый биохимическими медиаторами и сигнальными путями рецепторов. Таким образом, разрешение осуществляется специализированными медиаторами, способствующими разрешению. Воспаление представляет собой спонтанный механизм, возникающий при инфекции, ранении или травме. Воспаление является неизбежным и обычно благотворным, а его реакция управляется тонким балансом между положительными и отрицательными петлями обратной связи. Воспаление обычно разделяют на 3 стадии: инициация, усиление и разрешение.

Процесс разрешения, который позволяет прекратить воспалительную реакцию, представляет собой сложный процесс, включающий последовательное и хронологическое вовлечение клеточных (например, гранулоцитов или макрофагов) и химических (например, цитокинов или специализированных медиаторов или факторов, способствующих разрешению) эффекторов.

Хемокин-подобный рецептор 1 (CMKLR1), также известный как ChemR23, и хемокин-подобный рецептор-подобный 2 (CCRL2) представляют собой 7-трансмембранные рецепторы, идентифицированные по их гомологии с известными рецепторами, связанными с G-белком (AJ Kennedy and AP Davenport, 2018). Хемокин-

подобный рецептор 1 (CMKLR1; также называемый Dez у мышей) представляет собой сопряженный с G-белком орфанный рецептор, родственник с GPR-1 (38% общей аминокислотной идентичности), рецептором C3a (38%), рецептором анафилатоксина C5a (36%) и формиловыми рецепторами Met-Leu-Phe (35%). ChemR23 более отдаленно связан с подсемейством хемокиновых рецепторов (Samson et al., 1998). CMKLR1 экспрессируется на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и NK-клетках, а также на адипоцитах и эндотелиальных клетках. Недавние исследования идентифицировали лиганды для этих рецепторов, и их функции начали раскрываться. Соответственно, первый хемоаттрактант, полученный из белков плазмы, названный хемерином, был идентифицирован как лиганд для CMKLR1.

Вторым лигандом CMKLR1 является липидный медиатор резолвин E1 (RvE1), принадлежащий к семейству резолвинов. Противовоспалительный липидный медиатор резолвин E1 ингибирует инфильтрацию лейкоцитов и экспрессию провоспалительных генов.

Первоначально интерес к хемериновой системе (то есть сигнальным путям, активируемым или не активируемым хемериновыми рецепторами их лигандами, такими как хемерин и резолвин) был сосредоточен на ее роли в воспалении и хемотаксисе иммунных клеток после ее открытия при псориазе. Совсем недавно в связи с его ролью в воспалении, ожирении, метаболическом синдроме рассматривалась его потенциальная роль в связи с сердечно-сосудистыми функциями, а также роль в репродуктивной биологии. Следовательно, система хемерина представляет большой интерес из-за ее роли в процессе воспаления, в частности, из-за ее роли в разрешении воспаления. Ряд заболеваний связан с задержкой или нарушением процесса разрешения. Большинство известных в настоящее время специализированных медиаторов факторов, способствующих разрешению, происходят из полиненасыщенных жирных кислот, включая липоксины, семейство резолвинов, включая резолвины серии E и резолвины серии D, протектинов и марезинов. Тем не менее, молекулы, способствующие разрешению, трудно синтезировать из-за их липидной природы. Получение молекул, способствующих разрешению, в достаточных количествах, например, для клинических испытаний, является обременительным, и очень немногие SPM прошли эффективное производство. Кроме того, сложно получить антитела, специфически нацеленные на рецепторы, связанные с G-белком. Поэтому существует потребность в молекулах, обладающих способностью принимать участие, в частности, инициировать или усиливать стадию разрешения воспалительной реакции, подобно факторам, способствующим разрешению.

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к гуманизованному анти-СМКLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, миметику антигенсвязывающего антитела или модифицированному антителу.

Авторы изобретения стремились получить улучшенные гуманизованные антитела по сравнению с анти-СМКLR1 антителом дикого типа, известным в предшествующем уровне техники. Хотя известно, что некоторые остатки в последовательностях CDR и каркаса (FR) переменного домена, включая остатки в зоне Вернье, канонические остатки, остатки на границе раздела переменной области тяжелой и переменной легкой цепи и т.д., являются критическими в структуре антитела и не должны подвергаться мутациям для сохранения биохимической и биологической активности антитела, авторы неожиданно обнаружили, что некоторые мутации в последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или переменного домена легкой цепи антитела дикого типа, включая некоторые из таких критических остатков, позволяют увеличить содержание человеческих остатков (до 99% гуманизации), при этом функциональные признаки, связанные с этими гуманизованными антителами, не являются общими с анти-СМКLR1 дикого типа, в частности, которые улучшены, и в то же время получение этих гуманизованных антител может быть улучшено по сравнению с менее или очевидно гуманизованными анти-СМКLR1 антителами. Эти гуманизованные антитела приводят к получению соединений, обладающих функциональными характеристиками, полезными при лечении заболеваний, в том числе заболеваний, сопровождающихся воспалением, которые могут быть получены в больших масштабах для разработки лекарственных средств-кандидатов. Комбинация этих двух признаков приводит к получению анти-СМКLR1 антител, обладающих улучшенными характеристиками по сравнению с антителами предшествующего уровня техники.

Начав с негуманизованного анти-СМКLR1 антитела и выбрав последовательности зародышевой линии человека, авторы изобретения сконструировали конкретные гуманизованные переменные домены тяжелой цепи и переменные домены легкой цепи. Гуманизованные переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, полученные из негуманизованного антитела, позволяют вырабатывать функциональные антитела в различных клеточных линиях, таких как, без ограничения указанным, клеточная линия яичника китайского хомяка (СНО), трансформированные клетки фибробластов почек африканской зеленой мартышки (COS-7) и клеточная линия эмбриональной почки человека (НЕК 293) в условиях, позволяющих восстанавливать значительный выход антител, которые связывают свою мишень с

активностью, которая может быть даже повышена по сравнению со связывающей активностью антитела дикого типа. Некоторые из полученных гуманизированных переменных доменов тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи были, в частности, дополнительно гуманизированы на первой стадии гуманизации, проведенной на каркасных областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей, что привело к получению антител, приспособленных к выработке с высоким выходом в различных клеточных линиях, с пониженной иммуногенностью и обладающих, по меньшей мере, функциональными признаками исходного антитела. Квалифицированный специалист не будет ожидать, что указанные мутации, особенно в таких положениях в доменах CDR и в каркасных областях переменного домена тяжелой и/или легкой цепи, приведут к получению анти-СМКLR1 антител с сохраненной связывающей способностью, в частности сохраненной аффинностью, сохраненной стабильностью, с сохранением резолвин-подобной агонистической способности этих антител в отношении СМКLR1 с пониженным индексом иммуногенности, с улучшением при этом масштаба выработки этих антител, содержащих переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи согласно изобретению, по сравнению с менее или по-другому гуманизированными антителами. Нельзя было спрогнозировать, что введение описанных мутаций, в частности, в CDR2 тяжелой цепи, приведет к улучшению выработки при сохранении свойств связывания и, предпочтительно, других функциональных свойств анти-СМКLR1 антител предшествующего уровня техники. Анти-СМКLR1 антитела, обладающие указанными характеристиками (связывающая способность, в частности аффинность, в отношении СМКLR1, в частности, в отношении конкретной третьей экстрапетли СМКLR1, низкая иммуногенность, хорошие масштабы выработки и способность резолвин-подобного агониста в отношении СМКLR1) применимы для эффективного лечения ряда заболеваний, включая заболевания, включающие воспаление, и, более конкретно, воспалительные заболевания.

Кроме того, как будет объяснено позже в настоящей заявке, было достигнуто несколько очень полезных биологических эффектов, связанных, в частности, с апоптозом нейтрофилов и, в частности, со снижением миграции и/или трансмиграции нейтрофилов и/или макрофагов, что приводит к сильному благотворному действию в разрешении воспаления. Таким образом, новые соединения позволяют сочетать потенциал выработки и биологическую активность.

Соответственно, в первом аспекте изобретения раскрыто антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с хемокин-подобным рецептором 1 (СМКLR1), в частности СМКLR1 человека, содержащее:

а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 61;

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

б) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с хемокин-подобным рецептором 1 (CMKLR1), в частности CMKLR1 человека, содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ 61; или VHCDR2 соответствует аминокислотной последовательности SEQ ID No. 12 или SEQ ID No. 63 при условии, что VHCDR1 не является SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 4;

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

б) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID

№. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В другом конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с хемокин-подобным рецептором 1 (CMKLR1), в частности CMKLR1 человека, содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61,

○ когда VHCDR1 представляет собой SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 4, а VHCDR2 соответствует аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, где указанный вариабельный домен тяжелой цепи (VH) не содержит каркасный VHFR3 из SEQ ID No. 70, предпочтительно с условием, что указанный вариабельный домен тяжелой цепи (VH) содержит каркасный FR3 из SEQ ID NO: 69,

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

б) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В частности, предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывались с третьей внеклеточной петлей (EL3) CMKLR1, в частности с эпитопом, расположенным внутри третьей внеклеточной петли (EL3) CMKLR1; более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No: 2 или SEQ ID No. 59, или с эпитопом, расположенным в

пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с данным воплощением подходят для продуцирования в различных клеточных линиях, включая, без ограничения указанным, клеточные линии млекопитающих, с выходом продуцирования, подходящим для целей разработки лекарственного средства-кандидата, при том, что сохраняются способность к специфическому связыванию с внеклеточной третьей петлей CMKLR1 и его способность резолвин E1-подобного агониста по отношению к CMKLR1. Таким образом, гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть эффективно получены и обладают функциональными возможностями исходного антитела.

В конкретном аспекте изобретения, который можно отличить от определения антител по изобретению исключительно их доменами CDR, но который можно сочетать с таким определением в конкретных воплощениях, раскрыто антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с хемокин-подобным рецептором 1 (CMKLR1), в частности CMKLR1 человека, пригодным для продуцирования в клетках млекопитающих, таких как клетки COS или CHO или НЕК, в частности, с выходом более 0,1 мг/мл, в частности, с выходом более 1 мг/мл, более конкретно с выходом по меньшей мере 10 мг/мл и еще более конкретно с выходом более 100 мг/мл, где:

а) переменный домен тяжелой цепи (VH) содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) переменного домена тяжелой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No. 41, что составляет 100% для FR1, по меньшей мере 60% для FR2, по меньшей мере 78% для FR3 и по меньшей мере 80% для FR4; более конкретно 100% или FR1, по меньшей мере 80% для FR2, по меньшей мере 85% для FR3 и по меньшей мере 90% для FR4;

б) домен переменной легкой цепи (VL) содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) переменного домена легкой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No.50, который составляет по меньшей мере 60% для FR1, по меньшей мере 70% для FR2, по меньшей мере 75% для FR3 и по меньшей мере 80% для FR4 и, в частности, 100% для FR1, по меньшей мере 90% для FR2, по меньшей мере 90% для FR3 и 100% для FR4.

В частности, указанное гуманизированное анти-CMKLR1 антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с третьей внеклеточной петлей (EL3) CMKLR1, в частности, указанное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 59, или с эпитопом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60.

Авторы изобретения, начиная с анти-СМКLR1 антитела 2G1, синтезировали различные переменные домены тяжелой цепи и переменные домены легкой цепи. Гуманизированный переменный домен тяжелой цепи SEQ ID No. 41 и гуманизированный переменный домен легкой цепи SEQ ID No. 50 были особенно подходящими для продуцирования гуманизированных анти-СМКLR1 антител в клетке или клеточной линии, включая клетки млекопитающих, подобные клеткам CHO или клеткам COS или клеткам НЕК. После выбора конкретной последовательности зародышевой линии человека для конструирования переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, гуманизированные антитела с определенной в данном документе идентичностью в каркасных участках также могли быть получены в приличных количествах в клетке или клеточной линии с целью разработки антитела, которое может привести к лекарственному средству-кандидату. Существует большой интерес к предоставлению гуманизированных антител, которые могут продуцироваться в больших количествах в клетке или клеточной линии, в частности, в клетке или клеточной линии млекопитающих, для получения терапевтических антител. Конкретные анти-СМКLR1 антитела, представленные в настоящем документе, имеют очень сходную структуру с их родительским антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи SEQ ID No. 41 и переменный домен легкой цепи SEQ ID No. 50, что обеспечивает правильное продуцирование, конформацию и секрецию анти-СМКLR1 антител, тем самым обеспечивая получение антитела, которое связывается с конкретным эпитопом хемерин-подобного рецептора 1 и обладает способностью резолвин E1-подобного агониста, в отношении этого рецептора в количестве, достаточном для терапевтических целей.

В конкретном воплощении изобретения предлагается антитело, которое представляет собой гуманизированное антитело против хемерин-подобного рецептора 1 (СМКLR1) или его антигенсвязывающий фрагмент, подходящее для продуцирования в клетках млекопитающих, таких как клетки COS или CHO, в частности с выходом более 0,1 мг/мл, более конкретно с выходом более 1 мг/мл, более конкретно с выходом более 10 мг/мл, еще более конкретно с выходом более 100 мг/мл, где:

а) переменный домен тяжелой цепи (VH) содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) переменного домена тяжелой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No. 41, что составляет по меньшей мере 90%

для FR1, по меньшей мере 70% для FR2, по меньшей мере 80% для FR3 и по меньшей мере 80% для FR4;

b) домен вариабельной легкой цепи (VL) содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) вариабельного домена легкой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No.50, что составляет по меньшей мере 60% для FR1, по меньшей мере 80% для FR2, по меньшей мере 75% для FR3 и по меньшей мере 70% для FR4.

В частности, указанное гуманизированное анти-СМКLR1 антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с третьей внеклеточной петлей (EL3) СМКLR1; в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 59, или расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60.

В конкретном воплощении гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, определенного выше, такое гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7; и

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 и SEQ 61; и

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16; и

b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23; и

В конкретном воплощении гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, определенного выше, такое гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID

№. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7; и

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ 61; или VHCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 12 или SEQ ID No. 63 при условии, что VHCDR1 не является SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 4; и

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16; и

b) переменный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23; и

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33; и

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В другом конкретном воплощении гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, определенного выше, такое гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a) переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7; и

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61;

когда VHCDR1 представляет собой SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 4, а VHCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 12, указанный переменный домен тяжелой цепи (VH) не содержит каркасный VHFR3 из SEQ ID No. 70, предпочтительно при условии, что указанный переменный (VH) домен тяжелой цепи содержит VHFR3 из SEQ ID NO: 69; и

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16; и

b) переменный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID

№. 19, SEQ ID №. 20, SEQ ID №. 21, SEQ ID №. 22 и SEQ ID №. 23; и

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 24, SEQ ID №. 25, SEQ ID №. 26, SEQ ID №. 27, SEQ ID №. 28, SEQ ID №. 29, SEQ ID №. 30, SEQ ID №. 31, SEQ ID №. 32 и SEQ ID №. 33; и

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 34, SEQ ID №. 35 и SEQ ID №. 36.

Такое антитело обладает теми же полезными свойствами, что и антитела, определенные в соответствии с первым аспектом и вторым аспектом изобретения; то есть продуцирование с высоким выходом, специфическое связывание с эпитопом, расположенным в пределах третьей дополнительной петли хемерин-подобного рецептора 1, способность резолвина E1-подобного агониста.

Описанные антитела подходят для лечения состояния, при котором разрешение воспаления задерживается или нарушается. Все описанные в данном документе антитела подходят для индуцирования разрешения воспаления, и/или усиления разрешения воспаления, и/или инициирования разрешения воспаления.

В следующем описании гуманизованное анти-СМКLR1 соединение рассматривается как гуманизованное анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, либо миметик антигенсвязывающего антитела, либо модифицированное антитело. В конкретном воплощении изобретения указанное соединение определяется последовательностями его CDR. В более конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 соединение представляет собой антитело, определяемое последовательностями его CDR и его каркасных участков (FR). Анти-СМКLR1 соединение представляет собой соединение, которое специфически связывается с хемокин-подобным рецептором 1 (СМКLR1). В следующем описании термины «хемокин-подобный рецептор 1», СМКLR1 и ChemR23 используются взаимозаменяемо, и все они обозначают рецептор, кодируемый геном СМКLR1 у человека или *cmklr1* у животных, отличных от человека. В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 соединение специфически связывается с СМКLR1 человека или, другими словами, изобретение относится к анти-СМКLR1 соединению человека. Используемый в данном документе термин «СМКLR1» относится к белку хемокин-подобного рецептора 1 (также обозначаемому как *chemR23*), представителя семейства рецепторов млекопитающих, связанных с G-белком, предпочтительно СМКLR1 человека. Референсная последовательность белка СМКLR1 человека, использованная в примерах настоящей заявки, соответствует последовательности, связанной с учетным номером Uniprot Q99788 (SEQ ID №: 1).

В конкретном аспекте изобретение относится к анти-СМКLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, или модифицированному антителу, определяемому по меньшей мере одним функциональным признаком. В предпочтительном воплощении указанное анти-СМКLR1 соединение определяется его способностью ингибировать секрецию провоспалительных цитокинов, в частности IL12, и/или его способностью усиливать секрецию противовоспалительных цитокинов, в частности IL10. В более конкретном воплощении анти-СМКLR1 соединение ингибирует или усиливает секрецию цитокинов макрофагами, в частности, провоспалительными макрофагами и/или макрофагами, способствующими разрешению воспаления. В конкретном воплощении анти-СМКLR1 соединение по изобретению усиливает поляризацию макрофагов в противовоспалительные макрофаги, в частности макрофаги, способствующие разрешению. В конкретном воплощении анти-СМКLR1 соединение по изобретению усиливает апоптоз нейтрофилов по сравнению с контрольным антителом.

В конкретном аспекте изобретение относится к анти-СМКLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, которое обладает свойствами агониста по отношению к взаимодействию резолвина E1 (RvE1)/СМКLR1, тем самым имитируя по меньшей мере один из эффектов, индуцированных путем связывания RvE1 с СМКLR1 на СМКLR1-положительных клетках. «Агонистические свойства по отношению к взаимодействию RvE1-СМКLR1» означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или миметик антигенсвязывающего антитела, или модифицированное антитело по настоящему изобретению, нацеленное на СМКLR1, обладает эффектом имитации по меньшей мере одного из эффектов, обеспечиваемых связыванием RvE1 с СМКLR1, тем самым активируя сигнальный путь рецептора, обычно активируемый RvE1, особенно связывание RvE1 человека с СМКLR1 человека, в частности, на дендритных клетках, нейтрофилах, моноцитах и макрофагах. В результате связывания и активации рецептора для получения биологического ответа соединения по изобретению могут приводить к активации сигнального пути G-белка, в частности, сигнального пути Gαi и/или Gαo, без активации пути β-аррестина. В частности, соединение по изобретению может приводить к ингибированию пути β-аррестина. В частности, связывание соединения по изобретению индуцирует активацию белка(ов) Akt и/или Erk *in vitro* и/или *in vivo*. В конкретном воплощении соединение можно рассматривать как анти-СМКLR1 агонист, обладающий резолвин E1-подобной способностью, когда сигнальный путь G-белка активируется в СМКLR1-положительных клетках, стимулированных соединением по изобретению, и, в

более конкретном воплощении, также когда путь В-аррестина не активирован, и в конкретных условиях, когда путь В-аррестина ингибируется. Другими словами, антитело - резолвин E1-подобный агонист, может быть определено как антитело, способное связывать CMKLR1 и, таким образом, способное индуцировать фосфорилирование белка(ов) Akt и/или Erk по сравнению с контрольным антителом. Контрольное антитело может представлять собой антитело, которое специфически не связывается с CMKLR1. Фосфорилирование белка можно определить способами, хорошо известными специалистам в данной области, например, способом, раскрытым в примерах настоящего описания. В конкретном воплощении соединение по изобретению усиливает активацию пути G-белка, индуцированного CMKLR1. В другом воплощении соединение по изобретению не индуцирует активацию пути β -аррестина, индуцированную CMKLR1. В другом воплощении соединение по изобретению ингибирует путь β -аррестина, индуцированный CMKLR1. В другом воплощении, поскольку соединение по изобретению индуцирует по меньшей мере один агонистический эффект связывания RvE1 с CMKLR1, и поскольку RvE1 представляет собой фактор, способствующий разрешению, или медиатор, способствующий разрешению, соединение по изобретению представляет собой фактор, способствующий разрешению, или медиатор, способствующий разрешению; например фактор, способствующий разрешению, может быть определен как соединение, которое ингибирует путь β -аррестина, индуцированный CMKLR1, и/или усиливает активацию пути G-белка, индуцированного CMKLR1, в CMKLR1-положительных клетках по сравнению с контрольным соединением, которое известно тем, что специально не взаимодействует с CMKLR1. Активацию/ингибирование этих путей можно оценить в соответствии со способами, раскрытыми в рабочих примерах изобретения. В конкретном воплощении эффект соединения-агониста оценивают в клетках человека.

В конкретном воплощении соединение по изобретению не препятствует связыванию хемерина с CMKLR1. Хемерин является одним из природных лигандов CMKLR1. Другими словами, соединение по изобретению не является агонистом и/или не антагонистом взаимодействия между хемерином и CMKLR1. Отсутствие такой агонистической и/или антагонистической способности можно оценить в соответствии с примерами по изобретению, где раскрыт конкурентный анализ для измерения хемерин-зависимого рекрутирования бета-аррестина рецептором CMKLR1 в присутствии анти-CMKLR1 антитела по изобретению. В предпочтительном воплощении анти-CMKLR1 соединение по изобретению не конкурирует с хемерином за связывание с CMKLR1. Отсутствие конкуренции между анти-CMKLR1 соединением по изобретению и хемерином можно определить, когда в присутствии соединения CMKLR1 по изобретению

связывание хемерина с CMKLR1 составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно аналогично связыванию хемерина с CMKLR1 в тех же экспериментальных условиях, но без присутствия анти-CMKLR1 по изобретению. Альтернативно, отсутствие конкуренции между анти-CMKLR1 соединением по изобретению и хемерином можно определить в соответствии со способом, показанным в примере 9.

В конкретном воплощении анти-CMKLR1 соединение обладает способностью *in vitro* и/или *in vivo* активировать по меньшей мере один из белков сигнального пути Akt (также известный как путь PI3K-Akt) и/или белок сигнального пути Erk, предпочтительно белок Akt и/или белок Erk, предпочтительно оба белка Akt и Erk. Активацию пути можно оценить способами, известными в данной области, и, в частности, способами, раскрытыми в примерах настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к агонисту CMKLR1, обладающему резолвин E1-подобным свойством, для применения при терапевтическом лечении воспалительного состояния у пациента, в частности воспалительного состояния, при котором фаза разрешения воспаления задерживается или прерывается, в частности, при хроническом воспалении, в частности, указанный агонист выбирают из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пептида, полипептида и белка.

В последующем описании, без каких-либо противоречащих указаний, агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, может быть идентифицирован как конкретный или некий «агонист»; оба термина включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (также ссылаемся на анти-CMKLR1 антитело), белок, пептид или полипептид; термин соединение или анти-CMKLR1 соединение также может использоваться в следующем описании как синоним «агониста» (по изобретению), тем самым включая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (также называемое анти-CMKLR1 антителом), белок, пептид или полипептид. Среди эффектов, обеспечиваемых применением такого агониста, были продемонстрированы следующие конкретные эффекты:

- агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, индуцирует апоптоз полиморфноядерных нейтрофилов (также называемых в данном документе просто нейтрофилами, PMN) и/или снижает или ингибирует миграционную способность этих клеток, в частности, посредством ингибирования их способности трансмигрировать через эндотелий к месту воспаления, как описано ниже в заявке;

- агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, индуцирует интернализацию различных рецепторов, экспрессируемых на клеточной поверхности различных миелоидных клеток, особенно макрофагов и/или дендритных клеток, тем самым усиливая процессы, которые индуцируют или поддерживают разрешение воспаления, как описано далее в заявке;

- в частности, агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, индуцирует интернализацию различных рецепторов CMKLR1 и CXCR4 и/или CCR7, экспрессируемых на клеточной поверхности макрофагов и/или дендритных клеток, причем такая интернализация приводит к гораздо более снижению направленному воздействию на и распознаванию рецепторов CXCR4, CCR7 цитокинами, которые, как известно, индуцируют миграцию клеток в направлении к очагу воспаления и, как следствие, приводят к уменьшению или ингибированию миграции макрофагов и/или дендритных клеток из очага воспаления во вторичные лимфоидные органы и/или по направлению к очагу воспаления;

- агонист CMKLR1, обладающий резолвин-E1-подобной способностью, снижает или ингибирует способность нейтрофилов и макрофагов и/или дендритных клеток к миграции; в частности, уменьшает или ингибирует способность нейтрофилов к трансмиграции через очаг воспаления за счет снижения способности этих клеток к роллингу из-за интернализации и/или уменьшения экспрессии CD62L на клеточной поверхности, снижая их способность к трансмиграции через эндотелий;

- в конкретном аспекте изобретения авторы продемонстрировали, что агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, содержащий домен, пригодный для взаимодействия с Fc-рецептором, такой как константный домен IgG, в частности константный домен IgG1, является особенно эффективным. Fc-рецепторы макрофагов или нейтрофилов особенно эффективно распознают Fc-фрагмент константного домена IgG против CMKLR1 или константный домен IgG1, что приводит или способствует апоптозу нейтрофилов, распознаваемому анти-CMKLR1 IgG1-антителами.

- Авторы настоящего изобретения демонстрируют, что миелоидные клетки, которые вовлечены в процесс воспаления (т.е. которые поддерживают воспаление) и которые экспрессируют CMKLR1 и CXCR4 и/или CCR7, являются особенно подходящими мишенями для агониста CMKLR1, обладающего резолвин E1-подобным свойством, для лечения патологического воспалительного процесса.

Изобретение, в частности, относится к агонисту анти-хемерин-подобного рецептора 1 (CMKLR1), обладающему резолвин E1-подобным свойством, для применения при лечении пациента, страдающего воспалительным состоянием, в частности

воспалительным состоянием, при котором разрешение воспаления задерживается или нарушается, при этом агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пептида, полипептида и белка, и при этом агонист:

- индуцирует или активирует апоптоз нейтрофилов в очаге воспаления и/или
- ингибирует или снижает способность нейтрофилов к трансмиграции через эндотелий к очагу воспаления и/или
- ингибирует миграцию макрофагов и/или дендритных клеток из очага воспаления во вторичные лимфоидные органы и/или в сторону очага воспаления.

- Изобретение относится к применению агониста CMKLR1, обладающего резолвин E1-подобным свойством, подобно антителу, в частности гуманизованному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, для индукции, усиления или активации апоптоза нейтрофилов при лечении воспалительного состояния, в частности воспалительного состояния, при котором разрешение воспаления замедлено или нарушено.

В конкретном воплощении изобретение относится к гуманизованному анти-CMKLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, миметику антигенсвязывающего антитела или модифицированному антителу.

Используемый в данном документе термин «антитело» включает поликлональные антитела, моноклональные антитела или рекомбинантные антитела. Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к составу молекул антител для получения антител, которые имеют общую аминокислотную последовательность тяжелой и легкой цепей, в отличие от «поликлональных» составов антител, которые содержат смесь антител с различными аминокислотными последовательностями. Моноклональные антитела могут быть получены несколькими известными технологиями, такими как фаговый, бактериальный, дрожжевой или рибосомный дисплей, а также классическими способами, примерами которых служат антитела, полученные из гибридом. Их также можно синтезировать, используя описанные аминокислотные последовательности в качестве референсных последовательностей. Таким образом, термин «моноклональный» используется для обозначения всех антител, полученных из одного клона нуклеиновой кислоты.

Используемый в данном документе термин «антитело» дополнительно включает антитела, которые были модифицированы по сравнению с антителом дикого типа; и охватывают химерные антитела, гуманизованные антитела, модифицированные антитела и антигенсвязывающие миметики антител. Конкретным референсным антителом

дикого типа в контексте изобретения является антитело 2G1.

Антитела по настоящему изобретению включают рекомбинантные антитела. Используемый в данном документе термин «рекомбинантное антитело» относится к антителам, которые продуцируются, экспрессируются, генерируются или выделяются рекомбинантными средствами, таким как антитела, которые экспрессируются с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина; антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител; антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным благодаря генам иммуноглобулина человека; или антитела, которые продуцируются, экспрессируются, генерируются или выделяются любым другим способом, в котором определенные последовательности гена иммуноглобулина (такие как последовательности гена иммуноглобулина человека) объединены с другими последовательностями ДНК. Рекомбинантные антитела включают, например, химерные и гуманизированные антитела.

Используемый в данном документе термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором последовательность переменного домена, полученного из зародышевой линии млекопитающих, таких как мышь, привита к последовательности константного домена, полученной из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например человека.

Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело» относится в первом воплощении к антителу, в котором последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например мыши, были привиты к человеческим или особенно гуманизированным каркасным последовательностям. В другом воплощении «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором гуманизированы по меньшей мере одна CDR и все или часть каркасных последовательностей.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент антитела» означает часть антитела, т.е. молекулу, соответствующую части структуры антитела по изобретению, которая проявляет антигенсвязывающую способность в отношении CMKLR1, возможно, в ее нативной форме; такой фрагмент в частности проявляет такую же или по существу такую же антигенсвязывающую специфичность для указанного антигена по сравнению с антигенсвязывающей специфичностью соответствующего четырехцепочечного антитела. Преимущественно антигенсвязывающие фрагменты обладают аффинностью связывания, аналогичным аффинности соответствующих 4-цепочечных антител. Однако антигенсвязывающий

фрагмент, который имеет пониженную антигенсвязывающую аффинность по отношению к соответствующим 4-цепочечным антителам, также охватывается настоящим изобретением. Способность к связыванию антигена можно определить путем измерения аффинности между антителом и фрагментом-мишенью. Эти антигенсвязывающие фрагменты также могут быть обозначены как «функциональные фрагменты» антител.

Антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой фрагменты, которые содержат их гипервариабельные домены, обозначенные как CDR (комплементарные определяющие области), или их часть(и), охватывающую сайт узнавания антигена, то есть внеклеточный домен CMKLR1, в частности, третью петлю внеклеточного домена CMKLR1 (обозначенной как EL3), тем самым определяя специфичность распознавания антигена. EL3 локализован между аминокислотным остатком 283 и аминокислотным остатком 300 в SEQ ID No: 1. Аминокислотная последовательность домена EL3 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID No: 2. EL3 также содержится в полипептиде SEQ ID No: 52. Каждый вариабельный домен легкой и тяжелой цепи (соответственно VL и VH) четырехцепочечного иммуноглобулина имеет три CDR, обозначенные как VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 для вариабельного домена легкой цепи; и VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 для вариабельного домена тяжелой цепи. Каждый вариабельный домен легкой цепи и тяжелой цепи четырехцепочечного иммуноглобулина имеет четыре каркасных участка (FR), обозначенных как LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4 для вариабельного домена легкой цепи; и HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4 для вариабельного домена тяжелой цепи. Система номенклатуры, используемая для определения доменов CDR и доменов каркаса, представляет собой систему Kabat.

Специалист в данной области техники может определить местоположение различных областей/доменов антител с помощью стандартных определений, изложенных в этом отношении, включая ссылочную систему нумерации, ссылку на систему нумерации КАВАТ или с помощью алгоритма IMGT «collier de perle». В этом отношении для определения последовательностей по изобретению следует отметить, что разграничение областей/доменов может варьироваться от одной референсной системы к другой. Соответственно, области/домены, как определено в настоящем изобретении, охватывают последовательности, демонстрирующие вариации длины или локализации рассматриваемых последовательностей в пределах полноразмерной последовательности вариабельных доменов антител приблизительно +/- 10%.

Таким образом, исходя из структуры четырехцепочечных иммуноглобулинов, антигенсвязывающие фрагменты могут быть определены путем сравнения с последовательностями антител в доступных базах данных и предшествующего уровня

техники, и особенно путем сравнения расположения функциональных доменов в этих последовательностях, отмечая, что положения каркасного и константного доменов хорошо определены для различных классов антител, особенно для IgG, в частности для IgG млекопитающих. Такое сравнение также включает данные, относящиеся к трехмерным структурам антител.

Для целей иллюстрации конкретных воплощений изобретения антигенсвязывающие фрагменты антитела, которые содержат переменные домены, содержащие CDR указанного антитела, охватывают Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂. Фрагменты Fv состоят из доменов VL и VH антитела, связанных друг с другом посредством гидрофобных взаимодействий; во фрагментах dsFv гетеродимер VH:VL стабилизирован дисульфидной связью; во фрагментах scFv домены VL и VH связаны друг с другом посредством гибкого пептидного линкера, образуя таким образом одноцепочечный белок. Fab-фрагменты представляют собой мономерные фрагменты, которые можно получить расщеплением антитела папаином; они включают всю L-цепь и фрагмент VH-CH1 H-цепи, связанные вместе дисульфидной связью. Фрагмент F(ab')₂ может быть получен расщеплением пепсином антитела ниже шарнирного дисульфида; он включает два фрагмента Fab' и дополнительно часть шарнирной области молекулы иммуноглобулина. Фрагменты Fab' можно получить из фрагментов F(ab')₂ путем разрезания дисульфидной связи в шарнирной области. Фрагменты F(ab')₂ двухвалентны, т.е. содержат два антигенсвязывающих сайта, как и нативная молекула иммуноглобулина; с другой стороны, фрагменты Fv (димер VHVL, составляющий переменную часть Fab), dsFv, scFv, Fab и Fab' являются моновалентными, т.е. содержат один антигенсвязывающий сайт. Эти основные антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно комбинировать вместе для получения поливалентных антигенсвязывающих фрагментов, таких как диатела, тритела или тетратела. Эти мультивалентные антигенсвязывающие фрагменты также являются частью настоящего изобретения.

Используемый в настоящем документе термин «модифицированное антитело» включает «биспецифические» антитела и относится к антителам, которые распознают два разных антигена благодаря тому, что они обладают по меньшей мере одной областью (например, полученной из переменной области первого антитела), которая является специфичной в отношении первого антигена, и по меньшей мере вторую область (например, полученную из переменной области второго антитела), специфичную в отношении второго антигена. Биспецифическое антитело специфически связывается с двумя антигенами-мишенями и, таким образом, представляет собой один тип мультиспецифического антитела. Мультиспецифические антитела, которые распознают

два или более различных антигена, могут быть получены способами рекомбинантной ДНК или включают, без ограничения указанным, антитела, полученные химически любым подходящим способом. Биспецифические антитела включают все антитела или конъюгаты антител, или полимерные формы антител, которые способны распознавать два разных антигена. Биспецифические антитела включают антитела, которые были восстановлены и преобразованы, чтобы сохранить их бивалентные характеристики, и антитела, которые были химически связаны, так что они могут иметь несколько сайтов распознавания антигена для каждого антигена, таких как BiME (биспецифические антитела, усиливающие макрофаги), BiTE (биспецифический рекрутер Т-клеток), DART (переориентация с двойной аффинностью); DNL (dock-and-lock), DVD-Ig (иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом), HAS (человеческий сывороточный альбумин), kih (выступы-во-впадины).

Миметики антигенсвязывающих антител представляют собой органические соединения, которые специфически связывают антигены, но структурно не связаны с антителами. Обычно это искусственные пептиды или небольшие белки с молекулярной массой от около 3 до 20 кДа. Нуклеиновые кислоты и небольшие молекулы также иногда считаются миметиками антител, но не искусственными антителами, фрагментами антител и составленными из них гибридными белками. Обычными преимуществами по сравнению с антителами являются лучшая растворимость, проникновение в ткани, устойчивость к нагреванию и ферментам и сравнительно низкие производственные затраты. Миметики антител разрабатываются как терапевтические и диагностические агенты. Миметики антигенсвязывающего антитела также могут быть выбраны из группы, включающей аффитела, аффилины, аффимеры, аффитины, DARPin и монотела.

Миметик антигенсвязывающего антитела более предпочтительно выбирают из групп, включающих аффитины и антикалины. Аффитины — это искусственные белки, обладающие способностью избирательно связывать антигены. Они структурно происходят от ДНК-связывающего белка Sac7d, обнаруженного в *Sulfolobus acidocaldarius*, микроорганизме, принадлежащем к домену архей. Путем рандомизации аминокислот на поверхности связывания Sac7d, например, путем создания вариантов, соответствующих случайным заменам 11 остатков области взаимодействия при связывании Sac7d, может быть создана библиотека аффитинов, и подвергнуть полученную библиотеку белков циклам рибосомного дисплея, аффинность может быть направлена на различные мишени, такие как пептиды, белки, вирусы и бактерии. Аффитины представляют собой миметики антител и разрабатываются как инструменты в биотехнологии. Их также использовали в качестве специфических ингибиторов

различных ферментов (Kreihenbrink et al., *J. mol. Biol.*, 383:5, 2008). Квалифицированный специалист может легко разработать аффитины с требуемыми свойствами связывания, используя способы, известные в данной области, в частности, как описано в патентной заявке WO 2008068637 и процитированной выше публикации, в частности создание библиотек фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининга с использованием антигена, как описано в настоящем документе. Антикалины представляют собой искусственные белки, способные связываться с антигенами, либо с белками, либо с небольшими молекулами. Они представляют собой миметики антител, полученные из человеческих липокалинов, которые представляют собой семейство естественно связывающихся белков. Антикалины примерно в восемь раз меньше, имеют размер примерно 180 аминокислот и массу около 20 кДа (Skerra, *Febs J.*, 275:11, 2008). Были созданы библиотеки отображения фагов антикалина, которые позволяют проводить скрининг и отбор, в частности, антикалинов со специфическими свойствами связывания. Квалифицированный специалист может легко разработать антикалины с требуемыми связывающими свойствами, используя способы, известные в данной области техники, в частности, как описано в патенте EP1270725 B1, патенте US8536307 B2, Schlehuber and Skerra, *Biophys. Chem.*, 96:2-3, 2002, и цитируемой выше публикации, в частности создание библиотек фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининг с использованием антигена, как описано в данном документе. И антикалины, и аффитины могут быть получены в ряде систем экспрессии, включающих бактериальные системы экспрессии. Таким образом, изобретение включает применение аффитинов, антикалинов и других подобных миметиков антител с характеристиками описанных в данном документе антител, в частности, в отношении их способности связываться с CMKLR1, их способности агониста в отношении связывания между RvE1 и CMKLR1, их способности для индукции или ингибирования секреции определенных цитокинов, как описано в настоящем документе, для их применения при лечении или профилактике заболевания, как описано в настоящем документе, все из которых рассматриваются как миметики согласно изобретению.

Используемый в данном документе термин «модифицированное антитело» относится к антителам, аминокислотная последовательность которых была модифицирована путем мутации по меньшей мере одного аминокислотного остатка. Соответственно, «модифицированное антитело» включает химерные антитела или гуманизированные антитела, как определено в настоящем документе, «модифицированное антитело» может также соответствовать молекуле, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное моноклональное антитело или его

функциональный фрагмент ассоциированы с функционально другой молекулой. Модифицированное антитело по изобретению может представлять собой гибридный химерный белок или конъюгат, полученный в результате любой подходящей формы присоединения, включая ковалентное присоединение, прививку, химическое связывание с химической или биологической группой или с молекулой, такой как полимер ПЭГ или другой защитной группой или молекулой, подходящей для защиты от расщепления протеазами *in vivo*, для улучшения стабильности и/или периода полувыведения антитела или функционального фрагмента.

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие субпоследовательности антител, связывающиеся с мишенью), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все, по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все области CDR соответствуют областям нечеловеческого иммуноглобулина и/или его гуманизированной версии; и все или по существу все области FR являются областями матричной последовательности иммуноглобулина человека или содержат замену нечеловеческих остатков (таких как остатки грызунов) на аминокислотные остатки, присутствующие в матричной последовательности иммуноглобулина человека в соответствующем месте. Гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, выбранной матрицы человеческого иммуноглобулина. В конкретном воплощении изобретение относится к антителу, содержащему переменную область тяжелой цепи, как раскрыто в настоящем документе, и переменную область легкой цепи, как раскрыто в настоящем документе, переменная область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, дополнительно содержащую константную область, особенно Fc-область.

Термины «специфически связываться» и «специфически связываться с» относятся к способности антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, миметика антигенсвязывающего антитела или модифицированного антитела по изобретению связываться с CMKLR1 с аффинностью не менее 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M или более и/или связываться с CMKLR1 с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше его аффинности к неспецифической мишени (например, белку, отличному от CMKLR1). Аффинность может быть оценена различными способами, хорошо известными специалистам в данной

области. Эти способы включают, без ограничения указанным, биосенсоры, такие как анализ Biacore, анализ Blitz и график Скэтчарда.

Термин «терапевтически эффективное количество» используется для обозначения количества любого данного соединения, как определено в данном документе, достаточного, по меньшей мере, для улучшения клинического или физиологического состояния пациента, подвергающегося лечению. Терапевтически эффективное количество вводимого антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, миметика антигенсвязывающего антитела или модифицированного антитела по изобретению определяется такими факторами, как подлежащее лечению заболевание, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние индивидуального пациента, причина расстройства, место доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

Все воплощения, раскрытые в настоящем документе для антител или их антигенсвязывающих фрагментов, транспонированы *mutatis mutandis* в макромолекулы по изобретению, в частности, в антигенсвязывающие миметики антител и в модифицированные антитела.

В конкретном воплощении изобретения CMKLR1 представляет собой CMKLR1 человека, который соответствует учетному номеру белка NCBI Q99788.2.

Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи содержат 3 CDR (CDR1, CDR2 и CDR3 от 5'-конца до 3'-конца, соответственно) и 4 каркасных участка (FR1, FR2, FR3 и FR4 от 5'-конца до 3'-конца, соответственно). Гуманизация мышинового антитела может состоять в гуманизации по меньшей мере одной каркасной области в вариабельной области легкой цепи и/или в пределах вариабельной области тяжелой цепи, или в обеих областях. В конкретном воплощении несколько каркасных областей могут быть гуманизированы, в частности, в пределах вариабельной области тяжелой цепи и в пределах вариабельной области легкой цепи. CDR дикого типа могут быть консервативными, но также CDR могут быть заменены CDR, описанными в данном документе. Следовательно, анти-CMKLR1 соединение по изобретению может содержать по меньшей мере 1, или по меньшей мере 2, или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или 6 CDR дикого типа, когда каркасные области гуманизированы. Другими словами, анти-CMKLR1 соединение представляет собой гуманизированную версию исходного химерного антитела 2G1 (которое содержит вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID No. 37 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID No. 49), где по меньшей мере 1 каркасная область является гуманизированной, в частности, где гуманизированы по меньшей мере 1 каркасная область и по меньшей мере

1 CDR. В конкретном воплощении изобретения переменные области антитела могут быть связаны с константными областями антитела, такими как константные области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, особенно константная область IgG1. Эти константные области могут быть дополнительно мутированы или модифицированы способами, известными в данной области, для модификации их способности связывания с Fc-рецептором. В конкретном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением представляет собой гуманизованное моноклональное антитело, в частности, где константный домен легкой цепи антитела получен из константного домена легкой цепи каппа человека, в частности, где константный домен легкой цепи содержит или состоит из последовательности SEQ ID No: 79, и где константный домен тяжелой цепи антитела получен из константного домена тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, особенно константного домена тяжелой цепи IgG1, в частности, где константный домен тяжелой цепи антитела содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 80, SEQ ID No: 81, SEQ ID No: 82, SEQ ID No: 83 или SEQ ID No: 84, в частности, из константного домена тяжелой цепи IgG1 человека, в частности где константный домен тяжелой цепи антитела содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No:80 или SEQ ID No:83.

Связывание с полипептидом, включающим или состоящим из аминокислотных остатков последовательности SEQ ID No: 2 и/или SEQ ID No: 59, и/или расположенных внутри аминокислотной последовательности SEQ ID No 60, и/или для связывания с третьей экстра-петлей CMKLR1 можно оценить с помощью примеров, раскрытых в примерах изобретения, путем анализа аффинности связывания с помощью анализов ELISA. Чтобы определить, может ли тестируемое антитело конкурировать за связывание с тем же антигеном, или с третьей петлей, или с тем же эпитопом, который связывается с антителом 2G1 (или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, соответствующий SEQ ID No: 37 и домен легкой цепи, соответствующий SEQ ID No: 49), может быть проведен анализ перекрестного блокирования (например, конкурентный анализ ELISA). В примерном конкурентном анализе ELISA полипептид, содержащий или состоящий из эпитопа или третьей петли, может быть нанесен на лунки планшета для микротитрования и предварительно инкубирован с кандидатным конкурирующим антителом или без него, а затем с меченым биотином антителом 2G1 по изобретению. Количество меченого антитела анти-2G1, связанного с полипептидом, включающим или состоящим из полипептида SEQ ID No: 2 и/или SEQ ID No: 59 и/или расположенного в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No 60 и/или третьей петли CMKLR1 в лунках измеряют с использованием конъюгата авидин-

пероксидазы и соответствующего субстрата. Антитело может быть помечено радиоактивной или флуоресцентной меткой или какой-либо другой обнаруживаемой и измеряемой меткой. Количество меченого анти-2G1 антитела, которое связалось с полипептидом SEQ ID No: 2 и/или SEQ ID No: 59 и/или расположено в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No: 60 и/или с третьей петлей, будет иметь косвенную корреляцию со способностью конкурирующего антитела-кандидата (тестируемого антитела) конкурировать за связывание с одним и тем же эпитопом или с одной и той же петлей, т.е. чем выше аффинность тестируемого антитела к одному и тому же эпитопу, тем меньше меченого антитела 2G1 будет связано в лунках, покрытых антигеном. Кандидатное конкурирующее антитело считается антителом, которое конкурирует за связывание с тем же полипептидом или третьей петлей, что и антитело 2G1 по изобретению, когда антитело-кандидат может блокировать связывание антитела 2G1 по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 20-50%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 50% по сравнению с контролем, проводимым параллельно в отсутствие кандидатного конкурирующего антитела (но может связываться в присутствии известного неконкурирующего антитела). Следует понимать, что для получения одного и того же количественного значения можно осуществлять вариации этого анализа.

Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент оказывает действие фактора, способствующего разрешению воспаления, в частности, оказывает такое действие за счет взаимодействия с линиями миелоидных клеток.

В конкретном воплощении изобретения конкретный VHCDR2 присутствует в антителах, которые могут проявлять сниженную иммуногенность у человека, тем самым позволяя получать антитела, которые могут быть более активными для терапевтических целей, поскольку при введении пациенту антител с пониженной иммуногенностью ожидается снижение побочных эффектов.

В конкретном аспекте изобретения раскрыто антитело против хемокин-подобного рецептора 1 (СМКLR1) или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с СМКLR1, в частности СМКLR1 человека, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

а. переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID

No. 11, SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 61;

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

b. вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, расположенным в пределах третьей внеклеточной петли (EL3) CMKLR1, более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 59, или с эпитопом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60.

В другом конкретном аспекте изобретения раскрыто антитело против хемокин-подобного рецептора 1 (CMKLR1) или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CMKLR1, в частности CMKLR1 человека, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61; или VHCDR2 соответствует аминокислотным остаткам SEQ ID No. 12 или SEQ ID No. 63 при условии, что VHCDR1 не является SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 4;

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

b. вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID

№. 19, SEQ ID №. 20, SEQ ID №. 21, SEQ ID №. 22 и SEQ ID №. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 24, SEQ ID №. 25, SEQ ID №. 26, SEQ ID №. 27, SEQ ID №. 28, SEQ ID №. 29, SEQ ID №. 30, SEQ ID №. 31, SEQ ID №. 32 и SEQ ID №. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 34, SEQ ID №. 35 и SEQ ID №. 36.

В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, расположенным в пределах третьей внеклеточной петли (EL3) CMKLR1, более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID №. 2 или SEQ ID №. 59, или с эпитопом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID №. 60.

В другом конкретном аспекте изобретения раскрыто антитело против хемокин-подобного рецептора 1 (CMKLR1) или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CMKLR1, в частности CMKLR1 человека, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

а. переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 3, SEQ ID №. 4, SEQ ID №. 5, SEQ ID №. 6 и SEQ ID №. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 9, SEQ ID №. 10, SEQ ID №. 11 и SEQ ID №. 61;

когда VHCDR1 представляет собой SEQ ID №. 3 или SEQ ID №. 4, а VHCDR2 соответствует аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, где указанный переменный домен тяжелой цепи (VH) не содержит каркасный VHFR3 из SEQ ID №. 70, предпочтительно с условием, что указанный переменный домен тяжелой цепи (VH) содержит каркасный FR3 из SEQ ID NO: 69; и

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 13, SEQ ID №. 14, SEQ ID №. 15 и SEQ ID №. 16;

б. переменный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 17, SEQ ID №. 18, SEQ ID №. 19, SEQ ID №. 20, SEQ ID №. 21, SEQ ID №. 22 и SEQ ID №. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 24, SEQ ID №. 25, SEQ ID №. 26, SEQ ID №. 27, SEQ ID №. 28, SEQ ID №. 29, SEQ ID №. 30, SEQ ID №. 31, SEQ

ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом, расположенным в пределах третьей внеклеточной петли (EL3) CMKLR1, более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 59, или с эпитопом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60.

Связывание с эпитопом, расположенным в пределах третьей внеклеточной петли (EL3) CMKLR1, в частности, когда антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 59, или с эпитопом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60, можно оценить в соответствии со способом, раскрытым в данном документе выше. Конкретный выбор VHCDR2 может обеспечить получение антител с пониженной иммуногенностью по сравнению с антителами, имеющими другой VHCDR2.

Такое антитело является агонистом CMKLR1, имитирующим эффект связывания резолвина E1 с CMKLR1, т.е. обладает резолвин E1-подобной способностью, как определено в данном документе выше. Анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент оказывает действие фактора, способствующего разрешению воспаления, в частности, оказывает такое действие за счет взаимодействия с линиями миелоидных клеток.

В конкретном воплощении изобретения анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VHCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 3 и SEQ ID No. 4.

В конкретном воплощении изобретения анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VHCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61;

В конкретном воплощении изобретения анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VHCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 и SEQ ID No. 15.

В конкретном воплощении изобретения анти-CMKLR1 антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VLCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19 и SEQ ID No. 23.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VLCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27 и SEQ ID No. 33.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VLCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- VHCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 3 и SEQ ID No. 4; и/или

- VHCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61; и/или

- VHCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 и SEQ ID No. 15.

- VLCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19 и SEQ ID No. 23; и/или

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27 и SEQ ID No. 33; и/или

- VLCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В конкретном воплощении анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие CDR: VHCDR1 из SEQ ID NO: 4, VHCDR2 из SEQ ID NO: 12, VHCDR3 из SEQ ID NO: 13, VLCDR1 из SEQ ID NO: NO: 19, VLCDR2 из SEQ ID NO: 26 и VLCDR3 из SEQ ID NO: 35.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40, SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 89, SEQ ID No. 90 и SEQ ID No. 91.

В более конкретном воплощении анти-СМКLR1 антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 91.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 92 и SEQ ID No. 93.

В более конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 93.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40, SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 89, SEQ ID No. 90 и SEQ ID No. 91; и

- переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 92 и SEQ ID No. 93.

Любая комбинация конкретного переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, раскрытая в настоящем документе, охватывается настоящим изобретением.

В более конкретном воплощении анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40 и SEQ ID No. 62; и переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55 и SEQ ID No. 56.

В более конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 38, и переменный домен легкой цепи SEQ ID No. 49.

В более конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 91, и переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 93.

Кроме того, указанное антитело преимущественно характеризуется тем, что его Fc-фрагмент характерен для IgG1.

Во втором аспекте изобретения раскрыто соединение, выбранное из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или химерного, модифицированного или гуманизированного антитела, которое специфически связывается с CMKLR1, в частности с CMKLR1 человека, причем указанное соединение содержит переменный домен тяжелой цепи антитела, включающий (i) VHCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID No: 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 61, и (ii) VHCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15 и SEQ ID No: 16, или их мутантной последовательности, где аминокислотный(ые) остаток(ки) замещен(ы) при условии, что аминокислотные остатки в положениях 1 и 2 мутантной последовательности представляют собой, соответственно, L и I; и

где анти-CMKLR1 соединение специфически связывается с эпитопом, расположенным в пределах третьей внеклеточной петли (EL3) из CMKLR1, в частности, при этом соединение специфически связывается с полипептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 2 или SEQ ID No. 59 или с эпитопом, расположенным в аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60; и

где указанное соединение конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, соответствующий SEQ ID No: 37, и переменный домен легкой цепи, соответствующий SEQ ID No: 49, за связывание с полипептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 2, или SEQ ID No. 59, или последовательности SEQ ID No. 60, или с полипептидом, содержащим или состоящим из третьей петли (EL3) внеклеточного домена CMKLR1.

Комбинация переменного домена тяжелой цепи SEQ ID No. 37 и переменного домена легкой цепи SEQ ID No. 49 соответствует родительскому антителу 2G1. Связывание соединения с полипептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID No: 2 или SEQ ID No. 59, или расположенной в пределах SEQ ID No. 60, или с полипептидом, содержащим или состоящим из третьей петли (EL3) внеклеточного домена CMKLR1, можно оценить в

соответствии со способом, раскрытым в данном документе выше и проиллюстрированным в примерах изобретения.

В более конкретном воплощении анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 91.

В более конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 93.

В более конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 91, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 93.

Кроме того, указанное антитело преимущественно характеризуется тем, что его Fc-фрагмент характерен для IgG1.

Изобретение относится к любому из указанных выше соединений по изобретению для применения при профилактике и/или лечении заболевания, при котором разрешение воспаления задерживается или нарушается, и/или заболевания, выбранного из группы воспалительных заболеваний, в частности острых воспалительных заболеваний, хронических воспалительных заболеваний, таких как хронические воспалительные заболевания легких (например, астма), кератоконъюнктивит, заболевание пародонта, экзема, воспалительное заболевание кишечника, в частности болезнь Крона или колит, в частности язвенный колит или спонтанный колит, кистозный фиброз, кожные воспаления; аутоиммунные заболевания, такие как диабет, NASH, в частности диабет I типа, псориаз, волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, синдром Шегрена, глютеновая болезнь, васкулит, тяжелая миастения; инфекционные заболевания, такие как сепсис, тяжелые вирусные проявления с тяжелыми воспалительными состояниями, такие как коронавирус (например, COVID-19), перитонит; дегенеративные заболевания; нарушения заживления ран, синдром сухого глаза; онкологические заболевания, в частности солидные новообразования и гемобластоз, метастатические новообразования, в частности карциному, в частности карциному молочной железы или карциному ободочной кишки, или колоректальный рак, или рак легкого, или мезотелиому, или миелоидную злокачественную опухоль, в частности лейкоз, в частности злокачественную опухоль, при котором злокачественные опухолевые клетки экспрессируют СМКLR1 или когда микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или

сверхэкспрессирующими CMKLR1.

Фиброз (особенно фиброз легких и печени), патологии ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела) и патологии (васкулит), обусловленные апоптозом нейронов, связанных с ChermR23, вызывают особое беспокойство.

В конкретном воплощении изобретение относится к любому из определенных выше соединений по изобретению для применения в профилактике и/или лечении заболевания, при котором разрешение воспаления замедлено или нарушено, и/или заболевания, выбранного из группы воспалительных заболеваний, в частности острых воспалительных заболеваний, хронических воспалительных заболеваний, таких как астма, кератоконъюнктивита, пародонтоза, экземы, воспалительного заболевания кишечника, в частности болезни Крона или колита, в частности язвенного колита или спонтанного колита; муковисцидоза, аутоиммунных заболеваний, таких как диабет, в частности диабет I типа, псориаза, волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, глютеновой болезни, васкулита, тяжелой миастении; инфекционных заболеваний, таких как сепсис, перитонит; тяжелых вирусных заболеваний с тяжелыми воспалительными состояниями, такими как коронавирус (например, COVID-19), дегенеративные заболевания; нарушения заживления ран, NASH (неалкогольного стеатогепатита), склеродермии и синдрома сухого глаза. В другом конкретном воплощении изобретения изобретение относится к любому из определенных выше соединений по изобретению для применения при профилактике и/или лечении онкологического заболевания, в частности солидного новообразования и гемобластоза, метастатического новообразования, в частности карциномы, в частности, карциномы молочной железы или карциномы ободочной кишки, или колоректального рака, или рака легкого, или миелоидной злокачественной опухоли, в частности лейкоза, в частности злокачественной опухоли, при котором злокачественные опухолевые клетки экспрессируют CMKLR1 или когда микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CMKLR1.

В конкретном воплощении антитело по изобретению вызывает по меньшей мере один из следующих эффектов в пользу разрешения *in vitro* и/или *in vivo*:

- увеличивает апоптоз полиморфноядерных нейтрофилов, упоминаемых в данном документе под аббревиатурой PMN или PMNs, в участке воспаления; такой эффект проиллюстрирован в примерах изобретения. Регуляция апоптоза нейтрофилов имеет решающее значение для терапевтического вмешательства при воспалительных заболеваниях. Как показано в примерах изобретения, применение антитела, агониста CMKLR1, обладающего резолвин-E1-подобной способностью, антитела на PMN

индуцирует сильный апоптоз нейтрофилов по сравнению с контрольным антителом во время индукции воспаления.

- усиливает экспрессию каспазы-3 в нейтрофилах, тем самым приводя к каспаза-3-зависимому апоптозу; Можно считать, что апоптоз усиливается или индуцируется, когда экспрессия каспазы-3 превышает 1 log, более предпочтительно 2 log и наиболее предпочтительно 3 log после 11 часов обработки агонистом CMKLR1, имеющим резолвин E1-подобную способность антитела по сравнению с отрицательным контролем; способ раскрыт в примерах изобретения;

- уменьшает или ингибирует трансмиграцию через эндотелий PMNs (нейтрофилов) к очагу воспаления; предотвращая их перемещение к месту воспаления и оказывая провоспалительное действие. В конкретном воплощении изобретения миграцию и трансмиграцию нейтрофилов предотвращают или уменьшают путем введения агониста CMKLR1, обладающего резолвин-E1-подобной способностью антитела IgG1. Таким образом, в конкретном воплощении агонист CMKLR1, обладающий резолвин E1-подобным свойством, представляет собой гуманизированное антитело с константными областями человека, происходящими или полученными из IgG1 человека. В конкретном воплощении агонист CMKLR1, обладающий резолвин-E1-подобной способностью, представляет собой антитело изотипа IgG1 человека, т.е. константные фрагменты тяжелой цепи и легкой цепи происходят или вырабатываются из константного фрагмента тяжелой цепи и легкой цепи антитела IgG1 человека. Соответственно, агонист CMKLR1, обладающий резолвин-E1-подобной способностью, антитело по настоящему изобретению, содержит Fc-домен изотипа IgG1. Трансммиграцию нейтрофилов можно оценить способом, раскрытым в примерах изобретения; можно считать, что нейтрофил имеет сниженную способность к миграции и/или трансмиграции, когда экспрессия CD62L на клеточной поверхности снижена по меньшей мере на 1 log в эксперименте по окрашиванию по сравнению с отрицательным контролем. Авторы изобретения обнаружили, что гуманизированные антитела IgG1 по настоящему изобретению, являющиеся агонистами CMKLR1, обладающими резолвин-E1-подобной способностью, не проявляют цитотоксичности *in vivo*; другими словами, применение агониста CMKLR1 не приводит к значительному истощению CMKLR1-положительных клеток *in vivo*. В конкретном воплощении применение агониста по изобретению не проявляет цитотоксической активности в отношении CMKLR1-положительных клеток;

- снижает экспрессию CMKLR1, CXCR4 и/или CCR7 на клеточной поверхности. В конкретном воплощении рассматривается экспрессия клеточной поверхности на макрофагах и/или дендритных клетках. Когда агонист CMKLR1, обладающими резолвин-

E1-подобной способностью, связывается со своей мишенью, CMKLR1 и CXCR4 и/или CCR7 гетеродимеризуются и интернализуются. В предпочтительном воплощении антитело по изобретению индуцирует интернализацию и/или ингибирует экспрессию CMLKLR1, и/или CXCR4, и/или CCR7 на клеточной поверхности CMKLR1-положительных клеток. Таким образом, экспрессия CMLKLR1, CXCR4 и/или CCR7 на клеточной поверхности в клетках, инкубированных в присутствии антитела, снижена или значительно снижена по сравнению с экспрессией на клеточной поверхности в клетках, инкубированных в иных случаях идентичных условиях, но в отсутствие агониста CMKLR1, обладающего резолвин-E1-подобной способностью.

В конкретном аспекте изобретение относится к гуманизованному антителу против хемерин-подобного рецептора 1 (CMKLR1) или его антигенсвязывающему фрагменту, пригодному для продуцирования в клетках млекопитающих, таких как клетки COS или CHO, с выходом более 0,1 мг/мл, в частности более 1 мг/мл, в частности более 10 мг/мл и более конкретно более 100 мг/мл, где:

а) переменный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) переменного домена тяжелой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No. 41, что составляет 100% для FR1, по меньшей мере 60% для FR2, по меньшей мере 78% для FR3 и по меньшей мере 80% для FR4; более конкретно 100% для FR1, по меньшей мере 80% для FR2, по меньшей мере 85% для FR3 и по меньшей мере 90% для FR4;

б) домен переменной области легкой цепи (VL) содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) переменного домена легкой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No.50, что составляет не менее 60% для FR1, не менее 70% для FR2, не менее 75% для FR3 и не менее 80% для FR4; и более конкретно 100% для FR1, по меньшей мере 90% для FR2, по меньшей мере 90% для FR3 и 100% для FR4.

В конкретном воплощении гуманизованное анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с третьей внеклеточной петлей (EL3) CMKLR1, в частности, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID No: 2 или SEQ ID No. 59, или расположенная в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60. Это воплощение может привести к облегчению продуцирования антител (или их антигенсвязывающего фрагмента) *in vitro*.

Следует отметить, что это определение антитела не зависит от любого другого определения анти-СМКLR1 антитела по изобретению, включая определение антител по доменам CDR. В конкретном аспекте изобретения определение антитела по изобретению по последовательностям FR может быть объединено определением с доменами CDR и/или функциональными признаками. С этой целью настоящее изобретение также охватывает антитело, определяемое его FR-доменами и характеризующееся своими CDR-доменами, выбранными из конкретной группы. С этой целью такое антитело, которое может проявлять или не проявлять идентичность каркасным доменам, как раскрыто в настоящем документе, содержит по меньшей мере один, в частности шесть, из следующих CDR:

- VHCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No.3, SEQ ID No.4, SEQ ID No.5, SEQ ID No.6 и SEQ ID No.7; и/или

- VHCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ 61, SEQ ID No. 63 и SEQ ID No. 64; и/или

- VHCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16; и/или

и при этом переменный домен легкой цепи (VL) содержит:

- VLCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23; и/или

- VLCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33; и/или

- VLCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

В более конкретном аспекте по меньшей мере один из каркасных доменов HFR1, HFR2, HFR3, HFR4, LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4 выбран из следующих групп:

для VHFR1 из SEQ ID No. 65;

для VHFR2 SEQ ID No. 66, SEQ ID No. 67 или SEQ ID NO. 68;

для VHFR3 из SEQ ID No. 69 или SEQ ID No. 70;

для VHFR4 из SEQ ID No: 71;

для VLFR1 из SEQ ID No. 72;

для VHFR3 из SEQ ID No. 73 или SEQ ID No. 74;

для VLFR3 из SEQ ID No. 75 или SEQ ID No. 76

для VLFR4 из SEQ ID No. 77.

Следует понимать, что множество каркасных доменов или все они могут быть выбраны из групп, перечисленных в данном документе выше.

В более конкретном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с двумя предыдущими абзацами имеет аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID No: 41, SEQ ID No: 38, SEQ ID No: 42, SEQ ID No: 43, а аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи представляет собой последовательность SEQ ID No: 50.

В более конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие каркасные домены:

- VHFR1 из SEQ ID NO: 65
- VHFR2 из SEQ UD NO: 67,
- VHFR3 из SEQ ID NO: 69
- VHFR4 из SEQ ID NO: 71,
- VLFR1 из SEQ ID NO: 72,
- VLFR2 из SEQ ID NO: 73
- VLFR3 из SEQ ID NO: 76, и
- VLFR4 из SEQ ID NO: 77.

В более конкретном воплощении указанное антитело содержит следующие каркасные домены:

- VHFR1 из SEQ ID NO: 65
- VHFR4 из SEQ ID NO: 67,
- VHFR3 из SEQ ID NO: 69
- VHFR4 из SEQ ID NO: 71,
- VLFR1 из SEQ ID NO: 72,
- VLFR2 из SEQ ID NO: 73
- VLFR3 из SEQ ID NO: 76,
- VLFR4 из SEQ ID NO: 77,

и включает следующие CDR:

- VHCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No.3, SEQ ID No.4, SEQ ID No.5, SEQ ID No.6 и SEQ ID No.7; и/или

- VHCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ 61, SEQ ID No. 63 и SEQ ID No. 64; и/или

- VHCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16; и/или

и при этом переменный домен легкой цепи (VL) содержит:

- VLCDR1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18,

SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23; и/или

- VLCDR2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33; и/или

- VLCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

Этот воплощение может привести к облегчению продуцирования антител (или их антигенсвязывающего фрагмента) *in vitro*.

Изобретение, в частности, относится к гуманизованному анти-СМКLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, оптимизированному для снижения иммуногенности при сохранении высокой связывающей активности и стабильности и биологических функций, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат следующие CDR:

- VHCDR1 из SEQ ID NO: 4,
- VHCDR2 из SEQ ID NO: 12,
- VHCDR3 из SEQ ID NO: 13,
- VLCDR1 из SEQ ID NO: 19
- VLCDR2 из SEQ ID NO: 26, и
- VLCDR3 из SEQ ID NO: 35.

В конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, чьи последовательности CDR представляют собой SEQ ID NO: 4, 12, 13, 19, 26 и 35, содержат следующие каркасные домены:

- VHFR1 из SEQ ID NO: 65
- VHFR2 из SEQ ID NO: 67,
- VHFR3 из SEQ ID NO: 69
- VHFR4 из SEQ ID NO: 71,
- VLFR1 из SEQ ID NO: 72,
- VLFR2 из SEQ ID NO: 73
- VLFR3 из SEQ ID NO: 76,
- VLFR4 из SEQ ID NO: 77.

Настоящее изобретение, в частности, относится к анти-СМКLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, оптимизированному для снижения иммуногенности при сохранении высокой связывающей активности и стабильности, а также биологических функций, подходящих для получения *in vitro*. Анти-СМКLR1 антитело или антигенсвязывающее фрагмент согласно предыдущему абзацу имеет аминокислотную

последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID No: 91, и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи представляет собой последовательность SEQ ID No: 93.

Кроме того, указанное антитело преимущественно характеризуется тем, что его Fc-фрагмент характерен для IgG1.

В конкретном воплощении антитела по изобретению могут характеризоваться аминокислотной последовательностью каркасных доменов, как описано выше, и дополнительно характеризоваться аминокислотной последовательностью по меньшей мере одного из их доменов CDR. В частности, гуманизованное анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с данным воплощением содержит переменный домен тяжелой цепи VHCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ 61, SEQ ID No. 63 и SEQ ID No. 64.

В конкретном воплощении изобретения предлагается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит:

а) переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ 61; или VHCDR2 соответствует аминокислотным остаткам SEQ ID No. 12 при условии, что VHCDR1 не является SEQ ID No. 4;

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

б) переменный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36;

для профилактического или терапевтического лечения:

- воспалительного заболевания, в частности острого воспалительного заболевания,

хронического воспалительного заболевания, такого как хроническое воспалительное заболевание легких (например, астма), кератоконъюнктивита, заболевания пародонта, экземы, воспалительного заболевания кишечника, в частности болезни Крона или колита, в частности язвенного колита или спонтанного колита, муковисцидоза, NASH (неалкогольного стеатогепатита), фиброза печени, фиброза легких, заболевания, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулита, в частности, ANCA-опосредованного васкулита, склеродермии, в частности при которых, в результате введения терапии, усиливается разрешение воспаления;

- аутоиммунного заболевания, такого как диабет, в частности диабета I типа, псориаза, волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, глютенной болезни, васкулита, тяжелой миастении или инфекционного заболевания, такого как сепсис, перитонита, дегенеративных заболеваний, нарушения заживления ран или синдрома сухого глаза, тяжелых вирусных проявлений с тяжелыми воспалительными состояниями, такими как коронавирус (например, COVID-19), в частности, когда в результате применения лечения ускоряется разрешение воспаления;

- рака, в частности метастатического рака, солидного новообразования или гемобластоза, такого как карцинома, более конкретно гепатокарциномы, в частности карциномы молочной железы или карциномы ободочной кишки, или рака легкого, или миелоидного новообразования, такого как лейкоз, в частности рака, при котором раковые клетки экспрессируют CMKLR1 или где микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CMKLR1, в частности, при этом, в результате введения лечения, усиливается разрешение воспаления.

В другом конкретном воплощении изобретения предлагается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7;

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61;

когда VHCDR1 представляет собой SEQ ID No. 3 или SEQ ID No. 4, а VHCDR2 соответствует аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, где указанный вариабельный домен тяжелой цепи (VH) не содержит каркасный VHFR3 из SEQ ID No. 70, предпочтительно при условии, что указанный вариабельный (VH) домен тяжелой цепи содержит каркасный FR3 из SEQ ID NO: 69,

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23;

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33;

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36; для профилактики или терапевтического лечения заболеваний, как описано выше.

В конкретном воплощении изобретения гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или миметик антигенсвязывающего антитела, или модифицированное антитело содержат:

a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) вариабельного домена тяжелой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No. 41, что составляет 100% для FR1, по меньшей мере 60% для FR2, по меньшей мере 78% для FR3 и по меньшей мере 80% для FR4; более конкретно 100% или FR1, по меньшей мере 80% для FR2, по меньшей мере 85% для FR3 и по меньшей мере 90% для FR4;

b) Вариабельный домен легкой цепи (VL) содержит аминокислотную последовательность каркасов (FR1, FR2, FR3 и FR4) вариабельного домена легкой цепи, где каждый каркас имеет идентичную последовательность, соответственно, с каркасом того же ранга в последовательности SEQ ID No.50, который составляет по меньшей мере 60% для FR1, по меньшей мере 70% для FR2, по меньшей мере 75% для FR3 и по меньшей мере 80% для FR4 и, в частности, 100% для FR1, по меньшей мере 90% для FR2, по меньшей мере 90% для FR3 и 100% для FR4;

для профилактического или терапевтического лечения:

- воспалительного заболевания, в частности острого воспалительного заболевания, хронического воспалительного заболевания, такого как хроническое воспалительное заболевание легких (например, астма), кератоконъюнктивита, заболевания пародонта, экземы, воспалительного заболевания кишечника, в частности болезни Крона или колита, в частности язвенного колита или спонтанного колита, муковисцидоза, NASH (неалкогольного стеатогепатита), фиброза печени, фиброза легких, заболевания,

связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулита, в частности, ANCA-опосредованного васкулита, склеродермии, в частности при которых, в результате введения лечения, усиливается разрешение воспаления;

- аутоиммунного заболевания, такого как диабет, в частности диабета I типа, псориаза, волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, глютеновой болезни, васкулита, тяжелой миастении или инфекционного заболевания, такого как сепсис, перитонита, дегенеративных заболеваний, нарушения заживления ран, тяжелых вирусных проявлений с тяжелыми воспалительными состояниями, такими как коронавирус (например, COVID-19), или синдрома сухого глаза, в частности, когда в результате применения лечения ускоряется разрешение воспаления;

- рака, в частности метастатического рака, солидного новообразования или гемобластоза, такого как карцинома, более конкретно гепатокарциномы, в частности карциномы молочной железы или карциномы ободочной кишки, или рака легкого, или миелоидного новообразования, такого как лейкоз, в частности рака, при котором раковые клетки экспрессируют CMKLR1 или где микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CMKLR1, в частности, при этом, в результате введения лечения, усиливается разрешение воспаления.

В конкретном воплощении антитело содержит следующие каркасные домены,

- VHFR1 из SEQ ID NO: 65

- VHFR2 SEQ UD NO: 67,

- VHFR3 из SEQ ID NO: 69

- VHFR4 из SEQ ID NO: 71,

- VLFR1 из SEQ ID NO: 72,

- VLFR2 из SEQ ID NO: 73

- VLFR3 из SEQ ID NO: 76,

- VLFR4 из SEQ ID NO: 77,

и включает следующие CDR:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7; и/или

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 61;

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16;

и при этом переменный домен легкой цепи (VL) содержит:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID

№. 19, SEQ ID №. 20, SEQ ID №. 21, SEQ ID №. 22 и SEQ ID №. 23; и/или

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 24, SEQ ID №. 25, SEQ ID №. 26, SEQ ID №. 27, SEQ ID №. 28, SEQ ID №. 29, SEQ ID №. 30, SEQ ID №. 31, SEQ ID №. 32 и SEQ ID №. 33; и/или

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID №. 34, SEQ ID №. 35 и SEQ ID №. 36, и предназначен для профилактического или терапевтического лечения:

- воспалительного заболевания, в частности острого воспалительного заболевания, хронического воспалительного заболевания, такого как хроническое воспалительное заболевание легких (например, астма), кератоконъюнктивита, заболевания пародонта, экземы, воспалительного заболевания кишечника, в частности болезни Крона или колита, в частности язвенного колита или спонтанного колита, муковисцидоза, NASH (неалкогольного стеатогепатита), фиброза печени, фиброза легких, заболевания, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулита, в частности, ANCA-опосредованного васкулита, склеродермии, в частности при которых, в результате введения терапии, усиливается разрешение воспаления;

- аутоиммунного заболевания, такого как диабет, в частности диабета I типа, псориаза, волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, глютенной болезни, васкулита, тяжелой миастении или инфекционного заболевания, такого как сепсис, перитонита, дегенеративных заболеваний, нарушения заживления ран, тяжелых вирусных проявлений с тяжелыми воспалительными состояниями, такими как коронавирус (например, COVID-19), или синдрома сухого глаза, в частности, когда в результате применения лечения ускоряется разрешение воспаления;

- рака, в частности метастатического рака, солидного новообразования или гемобластоза, такого как карцинома, более конкретно гепатокарциномы, в частности карциномы молочной железы или карциномы ободочной кишки, или рака легкого, или миелоидного новообразования, такого как лейкоз, в частности рака, при котором раковые клетки экспрессируют CMKLR1 или где микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CMKLR1, в частности, при этом, в результате введения лечения, усиливается разрешение воспаления.

Такое конкретное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для профилактического или терапевтического лечения одного из описанных выше состояний отличается, в частности, тем, что оно содержит следующие CDR: VHCDR1 из SEQ ID NO: 4, VHCDR2 из SEQ ID NO: 12, VHCDR3 из SEQ ID NO: 13 и VLCDR1 из SEQ ID NO: 19, VLCDR2 из SEQ ID NO: 26, VLCDR3 из SEQ ID NO: 35 и следующие каркасы VHFR1 из SEQ ID NO: 65, VHFR2 из SEQ ID NO: 67, VHFR3 из SEQ ID NO: 69, VHFR4 из SEQ ID

NO: 71, VLFR1 из SEQ ID NO: 72, VLFR2 из SEQ ID NO: 73, VLFR3 из SEQ ID NO: 76, VLFR4 из SEQ ID NO: 77. В частности, для описанного выше профилактического или терапевтического применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела включает или состоит из SEQ ID NO: 91 и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела содержит или состоит из SEQ ID NO: 93.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей анти-СМКLR1 соединение, как описано в настоящем документе, в частности к фармацевтической композиции, содержащей анти-СМКLR1 соединение по изобретению и дополнительный терапевтический агент или фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей анти-СМКLR1 соединение по изобретению и терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из иммуномодулирующего средства, блокатора иммунных контрольных точек, активатора иммунных контрольных точек, антитела или анти-SIRPa антитела (P84 - анти-SIRPa мыши от Merck Millipore).

В другом аспекте изобретение относится к комбинации соединений, содержащей анти-СМКLR1 соединение, как описано в настоящем документе, в частности, к фармацевтической композиции, содержащей анти-СМКLR1 соединение по изобретению и анти-PD1 или анти-PDL1 соединение, в частности анти-PD1 соединение; такое соединение, в частности, выбрано из группы, состоящей из антитела, фрагмента антигенсвязывающего антитела, миметика антигенсвязывающего антитела, малой молекулы, такой как аптамер или пептид, модифицированного антитела, подобного, без ограничения указанным, гуманизированного или химерного антитела, способного связываться с PD1 или PDL1.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации соединений, включающих анти-СМКLR1 соединение, как описано в данном документе, в частности к фармацевтической композиции, включающей анти-СМКLR1 соединение по изобретению и анти-SIRPa соединение; такое соединение, в частности, выбрано из группы, состоящей из антитела, фрагмента антигенсвязывающего антитела, миметика антигенсвязывающего антитела, малой молекулы, такой как аптамер или пептид, модифицированного антитела, подобного, без ограничения указанным, гуманизированному или химерному антителу, способному связываться с SIRPa, в частности с SIRPa человека.

Изобретение также относится к комбинации, например, для лечения фиброза, включающей терапевтическое соединение, которое является или не является цитокином, и которое стимулирует макрофаги, способствующие разрешению.

В другом аспекте изобретение касается терапевтического применения анти-СМКLR1 соединения по изобретению, особенно для индукции и/или усиления разрешения воспаления, в частности для индукции и/или усиления разрешения воспаления, когда указанное разрешение замедлено или нарушено, ввиду лечения заболеваний, при которых распространение воспаления является патологическим или при которых продолжительность разрешения воспаления является патологической.

В конкретном воплощении изобретения соединение анти-СМКLR1 связывает СМКLR1 с аффинностью (значение KD) по меньшей мере $10E^{-8}$ М, более предпочтительно с аффинностью по меньшей мере $10E^{-9}$ М. Специфическое связывание между антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, или миметиком антигенсвязывающего антитела, или модифицированным антителом по изобретению и СМКLR1 (или участком СМКLR1, содержащим третью внеклеточную петлю, включая аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID No: 2 и 59 или расположенный в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60), что подразумевает, что антитело проявляет заметную аффинность к СМКLR1. «Заметная аффинность» включает связывание с аффинностью около 10^{-8} М (KD) или сильнее. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда аффинность связывания составляет от 10^{-8} М до 10^{-12} М, необязательно от 10^{-9} М до 10^{-10} М, в частности по меньшей мере 10^{-9} М. Реагирует ли связывающий домен специфически с или связывается с мишенью, можно легко протестировать, среди прочего, путем сравнения реакции указанного связывающего домена с белком-мишенью или антигеном с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от белка-мишени. Такое антитело по изобретению специфически связывает СМКLR1 и оказывает агонистическое действие по отношению к взаимодействию между RvE1 и СМКLR1. Способы определения специфичности и аффинности антител путем конкурентного ингибирования известны в данной области (см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Colligan et al., *Current Protocols in Immunology*, Green Publishing Assoc., NY (1992; 1993); Muller, *Meth. Enzym*, 92:589-601 (1983)). Эти способы включают, без ограничения указанным, анализ Вiascore, анализ Blitz, проточную цитометрию и анализ ELISA.

В конкретном воплощении изобретения анти-СМКLR1 соединение специфически связывается с эпитопом, локализованным в пределах третьей дополнительной петли СМКLR1, в частности, с эпитопом, локализованным в пределах последовательностей аминокислотных остатков, представленных в SEQ ID No: 2 или SEQ ID No: 59 или SEQ ID No. 60, в частности, SEQ ID No: 2. Анти-СМКLR1 соединение, связывающееся в этой

конкретной области CMKLR1, может иметь свойство агониста в отношении CMKLR1, тем самым имитируя связывание RvE1 с CMKLR1.

В другом аспекте изобретение относится к анти-CMKLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, или модифицированному антителу, как определено в данном документе выше, которое обладает способностью агониста по отношению к взаимодействию между RvE1 и CMKLR1, для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте изобретение относится к анти-CMKLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, или модифицированному антителу, как определено в данном документе выше, которое обладает способностью индуцировать активацию белка(ов) Akt и/или Erk *in vitro* и/или *in vivo*. Активацию этих белков можно оценить способами, описанными в примерах по настоящему изобретению. В частности, анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или миметик антигенсвязывающего антитела, или модифицированное антитело обладают способностью активировать либо белок Akt, и/или белок Erk, либо оба белка в макрофагах, в частности, в макрофагах человека.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения объекта, нуждающегося в этом, включающему введение указанному объекту эффективного количества анти-CMKLR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или миметика антигенсвязывающего антитела, как определено выше, которое обладает агонистической способностью к взаимодействию между RvE1 и CMKLR1, или, другими словами, который является RvE1-агонист-подобным фактором или модулятором.

Изменение поляризации макрофагов в пользу противовоспалительных клеток может быть полезным при ряде патологий или ситуаций. Как описано выше, эта модификация особенно полезна в контексте заболевания, выбранного из группы воспалительных заболеваний, включая, без ограничения указанным, острые воспалительные заболевания и хронические воспалительные заболевания, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, астму, кератоконъюнктивит, периодонтальное заболевание, экзему, колит, в частности язвенный колит или спонтанный колит, муковисцидоз; диабет, в частности диабет I типа, перитонит, псориаз, карциному, в частности карциному молочной железы или карциному ободочной кишки, раковые заболевания, метастатические раковые заболевания, рак легких, дегенеративное заболевание, инфекционное заболевание, в частности сепсис, аутоиммунные заболевания, NASH, склеродермию, колит или болезнь Крона у объекта, устойчивого к кортикостероидам и/или к иммуносупрессивному лечению.

Настоящее изобретение также относится к применению анти-СМКLR1 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или миметика антигенсвязывающего антитела, как определено выше, которое обладает свойством резолвин E1-подобного агониста, при получении лекарственного средства.

В другом аспекте изобретение относится к анти-СМКLR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, или модифицированному антителу, подобному, без ограничения указанным, гуманизированному или химерному антителу, как определено в данном документе выше, для его применения при лечении хронического воспалительного заболевания, в частности, при лечении хронического колита.

В другом аспекте изобретение относится к анти-СМКLR1 антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, как определено выше, которое обладает агонистической активностью по отношению к взаимодействию с СМКLR1, для применения при лечении задержанного или нарушенного разрешения воспалительного состояния, в частности воспалительного заболевания, при котором его разрешение замедлено или нарушено, и/или при лечении или предупреждении заболевания, выбранного из группы воспалительных заболеваний, включая, без ограничения указанным, острые воспалительные заболевания и хронические воспалительные заболевания, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, астму, кератоконъюнктивит, пародонтоз, экзему, колит, в частности язвенный колит или спонтанный колит, муковисцидоз, диабет, в частности диабет I типа, перитонит, псориаз, карциному, в частности карциному молочной железы или карциному ободочной кишки, онкологические заболевания, дегенеративное заболевание, инфекционное заболевание, в частности, сепсис, аутоиммунные заболевания.

Как определено в настоящем документе, «задержка или нарушение разрешения воспалительного состояния» происходит, когда разрешение воспаления задерживается или нарушается по сравнению с нормальным разрешением (т.е. разрешение, происходящее у пациента, который испытывает физиологическое разрешение после воспалительного явления). Задержка или дефект разрешения могут привести к повышенному проникновению гранулоцитов в очаг воспаления. Следовательно, задержку или дефект разрешения можно оценить путем количественного определения гранулоцитов в очаге воспаления. Популяцию гранулоцитов можно измерить, например, с помощью гистологии, цитометрии или непрямых биохимических методов, таких как количественное определение эластазы с помощью иммуноферментного анализа или молекулярного количественного определения с помощью ПЦР гранулоцитарного

рецептора 1). Задержку или дефект разрешения также можно оценить путем определения задержки апоптоза гранулоцитов, измеренной, например, с помощью цитологии с использованием специфических антител против аннексина 5. Дефект или задержку в разрешении воспаления также можно определить путем количественной оценки синтеза провоспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа, IL8 или IL12, и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10. Секрецию цитокинов можно оценить с помощью иммуноферментного анализа или ПЦР. Дефект или задержку разрешения воспаления также можно определить путем оценки активации факторов транскрипции, участвующих в синтезе воспалительных цитокинов, таких как NF-каппаВ, которую можно измерить, например, с помощью ядерной транслокации или вестерн-блоттинга и/или количественной оценкой уровня деградации IкаппаВ). Дефект или задержку разрешения воспаления также можно определить путем количественного определения специализированных медиаторов, способствующих разрешению (таких как липоксины, резолвины, протектины или марезины) или их предшественников (таких как 17-HDОНЕ или 14-HDОНЕ) с помощью масс-спектрометрии или иммуноферментного анализа. Дефект или задержка разрешения затем приводит к дефекту синтеза одного или нескольких из этих медиаторов. Дефект или задержку разрешения также можно определить, когда экспрессия рецепторов молекул разрешения снижена. Эти рецепторы могут быть выбраны из группы, включающей ALX, CMK1R1, GPR32 или GPR18. Альтернативно или дополнительно можно также оценить интернализацию и процессинг этих рецепторов в цитоплазме. Альтернативно или дополнительно можно также оценить экспрессию некоторых рецепторов воспалительных цитокинов или липидов, при этом сверхэкспрессия по сравнению с нормальным состоянием означает задержку или дефект разрешения воспаления. Эти состояния можно измерить с помощью гистологии, цитологии или ПЦР. Дефект разрешения может также приводить к снижению или ингибированию переключения провоспалительных макрофагов на макрофаги, способствующие разрешению, повреждению фагоцитоза или эффероцитоза тех же клеток. Следовательно, задержку или дефект разрешения можно оценить путем анализа переключения провоспалительных макрофагов на макрофаги, способствующие разрешению в конкретном состоянии по сравнению с нормальным состоянием, как показано в примерах по настоящему изобретению.

В соответствии с конкретным воплощением анти-CMKLR1 соединение можно использовать для лечения индивидуума, у которого имеется онкологическое заболевание, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, в частности, рака молочной железы, меланомы, рака ободочной кишки, в частности, карциномы ободочной кишки,

лейкоза, особенно острый миелоидный лейкоз, в частности, когда злокачественные опухолевые клетки сверхэкспрессируют CMKLR1.

В одном воплощении изобретение относится к анти-CMKLR1 человека антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или миметику антигенсвязывающего антитела, или модифицированному антителу, как определено выше, для его применения, как определено выше, где указанное анти-CMKLR1 антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик антигенсвязывающего антитела или модифицированное антитело по изобретению вводят пациенту с CMKLR1-положительной опухолью.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить объекту различными подходящими путями, например, внутривенно (в/в), подкожно (п/к) или внутримышечно (в/м). Анти-CMKLR1 соединение можно вводить отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством, например, вторым человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом примере антитело вводят вместе с другим агентом, например, иммуносупрессирующим агентом, средством, стимулирующим эритропоэз (ESA), в сочетании с терапевтическими клеточными композициями и т.п. В одном воплощении изобретение относится к анти-CMKLR1 соединению или его антигенсвязывающему фрагменту или миметику антигенсвязывающего антитела для его применения, как определено выше, где анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент объединены со вторым терапевтическим агентом.

Введение второго терапевтического средства может быть одновременным или неодновременным с введением анти-CMKLR1 соединения. В зависимости от природы второго агента совместное введение может быть приготовлено в виде комбинированного лекарственного средства (продукта), также известного как «комбо». Комбинация представляет собой комбинацию с фиксированной дозой, которая включает два или более активных фармацевтических ингредиента, объединенных в одну дозированную форму, которая производится и распространяется в фиксированных дозах. Но режим дозирования и/или способ введения также могут различаться.

В предпочтительном воплощении этот второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, клеточных терапевтических агентов (таких как CAR-T-клетки), антибиотиков и пробиотиков.

В частности, иммунотерапевтические агенты, применимые в контексте изобретения, выбирают из группы, состоящей из терапевтических вакцин (ДНК-, РНК-

или пептидных вакцин), блокаторов или активаторов иммунных контрольных точек, в частности адаптивных иммунных клеток (Т- или В-лимфоцитов) или иммуноконъюгатов. такие как конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Используемый в данном документе термин «иммунотерапевтические агенты» относится, в частности, к агентам, которые могут превратить противоопухолевые вакцины из интересных биологических феноменов в эффективные терапевтические агенты, включающим: факторы роста Т-клеток для увеличения числа и репертуара наивных Т-клеток, факторы роста для увеличения количество дендритных клеток (DC), агонисты для активации DC и других антигенпрезентирующих клеток (APC), адъюванты, позволяющие и усиливающие противоопухолевые вакцины, агонисты для активации и стимуляции Т-клеток, ингибиторы блокады контрольных точек Т-клеток, факторы роста Т-клеток, повышающие рост и выживаемость иммунных Т-клеток, агенты для ингибирования, блокирования или нейтрализации раковой клетки и иммуносупрессивные цитокины, полученные из иммунных клеток.

В данной области известны многочисленные блокаторы или активаторы иммунных контрольных точек. В контексте изобретения примерами блокаторов иммунных контрольных точек или активаторов адаптивных иммунных клеток (В- или Т-лимфоцитов), которые могут быть полезны, представляют собой анти-PDL1, анти-PD1, анти-CTLA4, анти-SIRPa; анти-CD137, анти-CD2, анти-CD28, анти-CD40, анти-HVEM, анти-BTLA, анти-CD160, анти-TIGIT, анти-TIM-1/3, анти-LAG-3, анти-2B4, и анти-OX40, анти-CD40-агонист, CD40-L, агонисты TLR, анти-ICOS, агонисты В-клеточных рецепторов и ICOS-L, в частности анти-CD137 и анти-SIRPa. В конкретном воплощении изобретения второе терапевтическое средство представляет собой анти-PDL1 или анти-PD1 соединение, в частности, анти-PD1 соединение и, более конкретно, анти-PD1 антитело. В конкретном воплощении изобретения второе терапевтическое средство представляет собой анти-SIRPa соединение, в частности анти-SIRPa антитело.

Указанный иммунотерапевтический агент также может представлять собой антитело, нацеленное на опухолевый антиген, в частности, выбранное из группы, состоящей из анти-Her2, анти-EGFR, анти-CD20, анти-CD19, анти-CD52.

Антитело можно вводить в эффективной дозе от около 1 нг/кг массы тела до около 30 мг/кг массы тела или более. В конкретных воплощениях дозировка может находиться в диапазоне от 1 мкг/кг до около 20 мг/кг, необязательно от 10 мкг/кг до 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до 5 мг/кг.

Термин «эффективная доза» или «эффективная доза» или «эффективное количество» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей

мере частичного достижения желаемого эффекта. Термин «эффективная доза» означает количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений или облегчения симптомов заболевания у пациента, уже страдающего от заболевания. Количества или дозы, эффективные для этого применения, будут зависеть от подлежащего лечению состояния, доставляемой конструкции антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтический агент, пути введения, размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента и общее состояние собственной иммунной системы пациента. Надлежащую дозу можно подобрать таким образом, чтобы ее можно было вводить пациенту однократно или в течение серии введений, и для получения оптимального терапевтического эффекта.

Дозирование для таких целей может повторяться по мере необходимости, т.е. ежедневно, раз в полгода, еженедельно, раз в полгода, ежемесячно или по мере необходимости во время рецидивов.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» означает композицию, пригодную для введения объекту или пациенту, такому как млекопитающее, особенно человеку. Как правило, «фармацевтическая композиция» является стерильной и обычно не содержит примесей, способных вызвать нежелательную реакцию у объекта (например, соединение(я) в фармацевтической композиции относятся к фармацевтической категории). Фармацевтические композиции могут быть разработаны для введения объектам или пациентам, нуждающимся в этом, с помощью ряда различных способов введения, включая пероральный, трансбуккальный, ректальный, парентеральный, внутрибрюшинный, внутрикожный, интратрахеальный и т.п.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант, которые можно использовать при приготовлении фармацевтической композиции, которые в целом безопасны, нетоксичны и не являются нежелательными ни с биологической, ни с иной точек зрения, и включают вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант, приемлемые для применения в ветеринарии, а также в фармацевтике для человека. «Фармацевтически приемлемый носитель», используемый в данном документе, включает как один, так и более чем один такой эксципиент, разбавитель, носитель и

адьювант.

В частности, изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте изобретение относится к терапевтическим средствам, в частности к комбинированным продуктам, содержащим в качестве активных ингредиентов: анти-SIRPa антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или миметик антигенсвязывающего антитела, как определено выше, и второе терапевтическое средство, где указанные активные ингредиенты составлены для отдельной, последовательной или комбинированной терапии, в частности, для комбинированного или последовательного применения.

В частности, изобретение относится к комбинированному продукту, включающему анти-СМКLR1 соединение, как определено выше, и второй терапевтический агент для одновременного, отдельного или последовательного применения лекарственного средства.

В одном воплощении изобретение относится к комбинированному продукту, как определено выше, где второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, клеточных терапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, антибиотиков и пробиотиков.

В одном воплощении изобретение относится к комбинированному продукту, как определено выше, где указанный иммунотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из терапевтических вакцин, блокаторов или активаторов иммунных контрольных точек, в частности клеток адаптивной иммунной системы (Т- и В-лимфоцитов) и конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В одном воплощении изобретение относится к комбинированному продукту, как определено выше, где указанный блокатор иммунных контрольных точек или активатор адаптивных иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов) выбран из группы, состоящей из анти-PDL1, анти-PD1, анти-SIRPA, анти-CTLA4, анти-CD137, анти-CD2, анти-CD28, анти-CD40, анти-HVEM, анти-BTLA, анти-CD160, анти-TIGIT, анти-TIM-1/3, анти-LAG-3, анти-2B4 и анти-OX40, агонисты анти-CD40, CD40-L, агонисты TLR, анти-ICOS, агонисты ICOS-L и В-клеточных рецепторов, в частности, выбранных из группы, состоящей из анти-PDL1, анти-PD1 и анти-CD137. В конкретном воплощении изобретения второе терапевтическое средство представляет собой анти-PDL1 или анти-PD1 соединение, в частности, анти-PD1 соединение и, более конкретно, анти-PD1 антитело. В конкретном воплощении изобретения второе терапевтическое средство

представляет собой анти-SIRPa соединение, в частности анти-SIRPa антитело.

В одном воплощении указанное иммунотерапевтический агент представляет собой антитело, нацеленное на опухолевый антиген, в частности, выбранное из группы, состоящей из анти-Her2, анти-EGFR, анти-CD20, анти-CD19, анти-CD52.

В одном аспекте изобретение относится к комбинированному продукту, как определено выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем изменения поляризации макрофагов до макрофагов, способствующих разрешению.

В одном воплощении изобретение относится к способу лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем изменения поляризации макрофагов до макрофагов, способствующих разрешению, у объекта, нуждающегося в этом, включающему одновременное, отдельное или последовательное введение указанному объекту эффективного количества комбинированного продукта, как определено выше.

В одном воплощении изобретение относится к применению комбинированного продукта, как определено выше, при изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, предрасположенного к индукции макрофагов, способствующих разрешению - воспалительных макрофагов.

В одном аспекте изобретение относится к комбинированному продукту, как определено выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении патологии, выбранной из группы, состоящей из воспалительных заболеваний, включая, без ограничения указанным, острые воспалительные заболевания и хронические воспалительные заболевания, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, NASH, склеродермию, астму, кератоконъюнктивит, пародонтоз, экзему, колит, в частности язвенный колит или спонтанный колит, муковисцидоз, диабет, в частности диабет I типа, перитонит, псориаз, карциному, в частности карциному молочной железы или карциному ободочной кишки, раковые заболевания, метастатические раковые заболевания, рак легкого, дегенеративное заболевание, инфекционное заболевание, в частности сепсис, аутоиммунные заболевания или для применения при вакцинации.

В воплощении изобретение относится к способу лечения патологии, выбранной из группы воспалительных заболеваний, включая, без ограничения указанным, острые воспалительные заболевания и хронические воспалительные заболевания, воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, NASH, склеродермию, астму, кератоконъюнктивит, пародонтоз, экзему, колит, в частности язвенный колит или

спонтанный колит, муковисцидоз, диабет, в частности диабет I типа, перитонит, псориаз, карциному, в частности карциному молочной железы или карциному ободочной кишки, раковые заболевания, метастатические раковые заболевания, рак легких, дегенеративные заболевания, инфекционное заболевание, в частности сепсис, аутоиммунные заболевания объекта, нуждающегося в этом, включающие одновременное, раздельное или последовательное введение указанному объекту эффективного количества комбинированного продукта, как определено выше.

Изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему анти-СМКLR1 соединение, как определено в данном документе. С этой целью изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты или группе молекул нуклеиновой кислоты, более конкретно к выделенной(ым) молекуле(ам) нуклеиновой кислоты и/или рекомбинантной(ым) молекуле(ам) нуклеиновой кислоты, которая кодирует(ют) любое анти-СМКLR1 соединение в соответствии с настоящим изобретением, более конкретно, которое кодирует(ют) переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков последовательностей, представленных в SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40 и SEQ ID No. 62; и переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков последовательностей, представленных в SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57 и SEQ ID No. 58. В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты или группе молекул нуклеиновой кислоты, более конкретно к выделенной молекуле(ам) нуклеиновой кислоты и/или рекомбинантной(ым) молекуле(ам) нуклеиновой кислоты, которая кодирует(ют) переменный домен тяжелой цепи антитела, состоящий из SEQ ID NO: 91, и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела, состоящий из SEQ ID NO: 93.

Молекула(ы) нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать регулирующие последовательности, такие как, без ограничения указанным, энхансеры, сайленсеры, промоторы, в частности промоторы экспрессии, сигнальный пептид, для транскрипции и экспрессии кодируемого переменного домена тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи. домен.

Изобретение также относится к вектору, содержащему полинуклеотид, как раскрыто в настоящем документе, или содержащему молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, как раскрыто в настоящем документе. Используемый в данном документе вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для переноса генетического материала в клетку, и в предпочтительном воплощении

позволяет экспрессировать полинуклеотид, встроенный в вектор. Термин вектор охватывает плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Вектор обычно содержит точку начала репликации, сайт множественного клонирования и селективируемый маркер. Сам вектор обычно представляет собой последовательность нуклеотидов, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген) и более крупную последовательность, которая служит «каркасом» вектора. Современные векторы могут включать дополнительные функции, помимо трансгенной вставки и каркаса: промотор, генетический маркер, устойчивость к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающую последовательность, метку для очистки белка. Векторы, называемые экспрессирующими векторами (экспрессирующими конструкциями), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и обычно имеют контрольные последовательности.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, выделенной клетке, клетке-хозяину, выделенной клетке-хозяину или клеточной линии, содержащей вектор, как определено выше. Используемые в данном документе термины, относящиеся к клеткам, предназначены для включения любой индивидуальной клетки или клеточной культуры, которые могут быть или были реципиентами векторов, экзогенных молекул нуклеиновых кислот и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию антитела по настоящему изобретению; и/или реципиентам самой конструкции антитела. Введение соответствующего материала в клетку можно проводить путем трансформации, трансфекции и т.п. Эти термины также предназначены для включения потомства или потенциального потомства одной клетки. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки, и также включают, без ограничения указанным, бактерии, дрожжевые клетки, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, кролика, макаки или человека.

В конкретном воплощении изобретения клетка или клеточная линия выбираются из группы, состоящей из клеток CHO, COS и HEK, и продуцируют по меньшей мере 0,1 мг/мл, в частности, по меньшей мере 1 мг/мл антител, в частности по меньшей мере 10 мг/мл, более конкретно по меньшей мере 100 мг/мл, при генной инженерии с помощью вектора, включающим векторы, экзогенные молекулы нуклеиновой кислоты и полинуклеотиды, кодирующие конструкцию антитела по настоящему изобретению; и/или реципиентов самой конструкции антитела.

Следующие фигуры и Примеры представлены для того, чтобы дать возможность обычным специалистам в данной области техники получить полное раскрытие и описание

того, как создавать и использовать настоящее изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением и не предназначены для того, чтобы показать, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными выполненными экспериментами. Хотя изобретение было описано со ссылкой на его конкретные воплощения, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения и могут быть заменены эквиваленты без отклонения от истинного смысла и объема изобретения. Кроме того, может быть сделано много модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, процесса, этапа или стадий процесса к цели, сущности и объему настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

В конкретном воплощении изобретение касается применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в любом из воплощений, раскрытых в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства. В конкретном воплощении изобретение касается применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в любом из воплощений, раскрытых в настоящем документе, для производства лекарственного средства, подходящего для лечения состояния, в которое вовлечено воспаление. В конкретном воплощении изобретение касается применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в любом из воплощений, раскрытых в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства, применимого для профилактического или терапевтического лечения:

- воспалительного заболевания, в частности острого воспалительного заболевания, хронического воспалительного заболевания, такого как хроническое воспалительное заболевание легких (например, астма), кератоконъюнктивита, заболевания пародонта, экземы, воспалительного заболевания кишечника, в частности болезни Крона или колита, в частности язвенного колита или спонтанного колита, муковисцидоза, NASH (неалкогольного стеатогепатита), фиброза печени, фиброза легких, заболевания, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), в частности при которых, в результате введения лечения, усиливается разрешение воспаления;

- аутоиммунного заболевания, такого как диабет, в частности диабета I типа, псориаза, волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, глютеновой болезни, васкулита, тяжелой миастении или инфекционного заболевания, такого как сепсис, перитонита, дегенеративных заболеваний, нарушения заживления ран, тяжелых вирусных проявлений с тяжелыми воспалительными состояниями, такими как

коронавирус (например, COVID-19), или синдрома сухого глаза, в частности, когда в результате применения лечения ускоряется разрешение воспаления;

- ракового заболевания, в частности метастатического ракового заболевания, солидного новообразования или гемобластоза, такого как карцинома, более конкретно гепатокарциномы, в частности карциномы молочной железы или карциномы ободочной кишки, или рака легкого, или миелоидного новообразования, такого как лейкоз, в частности ракового заболевания, при котором раковые клетки экспрессируют CMKLR1 или где микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CMKLR1, в частности, при этом, в результате введения лечения, усиливается разрешение воспаления;

- NASH (неалкогольного стеатогепатита), склеродермии, муковисцидоза или заболевания, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA).

Подписи к чертежам

Фиг. 1. Влияние анти-CMKLR1 вариантов химерных антител 1G1, 2G1, 3G1 и 4G1 на созревание и дифференцировку DC. Дендритные клетки мышей инкубировали во время фазы созревания (24 ч или 48 ч), за которой следовала фаза дифференцировки с эксципиентом или RvE1 или вариантами анти-CMKLR1 антител (мутации в положениях 1 и 2 SEQ ID No. 8, соответствующие VH-CDR3: 1G1 (LL), 2G1 (LI), 3G1 (IL) или 4G1 (II) или изотипические контроли (hIgG1 или mIgG)). Затем клетки окрашивали для анализа FACS антителами к клеточным маркерам: A. CD80-PE; B. CD86-FITC; C. CD103-PerCPCy5.5; D. I/Ab-APC. Среднее значение флуоресценции определяли в каждом состоянии. E и F представляют собой жизнеспособность клеток, измеренную с помощью FACS с использованием набора LIVE/DEAD® от Life Technologies в каждом состоянии после 24 или 48 часов созревания, соответственно.

Фиг. 2. Влияние анти-CMKLR1 антитела на модель острого воспалительного колита у мышей, индуцированного DSS. Через 6 дней после индукции DSS мышам вводили изотипический контроль hIgG1 (10 мкг на мышь) (x), RvE1 (1 мкг на мышь) ежедневно (●) или антитело 2G1 (10 мкг на мышь) три раза (□) в течение 5 дней. Мыши дикого типа, не подвергавшиеся терапии, обозначены ▼. A. Потеря массы животных. B. Оценка стула животного C. Длина ободочной кишки. D. Индекс разрешения.

Фиг. 3. Влияние анти-CMKLR1 антитела на модель острого воспалительного колита у мышей, индуцированного TNBS. Мыши получали 200 мкл 5% гаптенирующего агента TNBS в 50% этаноле в день 0, а затем им вводили изотипический контроль hIgG1 (10 мкг на мышь) (x), RvE1 (1 мкг на мышь) ежедневно (●) или антитело 2G1 (10 мкг на

мышь) три раза (□) в течение 5 дней или без терапии (животные дикого типа) (▲). Мышей умерщвляли, длину ободочной кишки измеряли в каждом состоянии.

Фиг. 4. Влияние анти-СМКLR1 антитела на модель хронического воспалительного колита у мышей с IL10 КО. У мышей с КО по IL10 развивается спонтанный воспалительный колит. Им вводили анти-СМКLR1 антитело (2G1) (□) или изотипический контроль (hIgG1) (x) внутрибрюшинно (25 мкг/инъекция, 3 раза в неделю). А. Потеря массы животного во время и после терапии. В. Оценка стула животных.

Фиг. 5. Эффект анти-СМКLR1 антитела на модели диабета типа 1 у мышей без ожирения. У мышей развивается спонтанный диабет. Когда гликемия составляла от 180 до 234 мг/дл, их обрабатывали анти-СМКLR1 антителом (□ в А и В, ■ в С) или антителом изотипического контроля (x в А и В; □ в С) внутрибрюшинно по 20 мкг/инъекцию три раза в неделю в течение 2 недель. А. Процент выживания, В. Индивидуальное представление концентрации глюкозы в крови в мг/дл. С. объединенное представление концентрации глюкозы в крови в мг/дл.

Фиг. 6. Влияние анти-СМКLR1 агониста на аутоиммунное заболевание, такое как модель псориаза у мышей. Мышам, получавшим Aldara, в течение 4-6 дней подряд внутрибрюшинно вводили: 2G1 (●) или контрольное изотипическое антитело (x). А. Толщина и В масса.

Фиг. 7. Влияние анти-СМКLR1 антитела на модель перитонита у мышей. Превентивная инъекция анти-СМКLR1 была проведена перед инъекцией зимозана А (1 мг на мышь в 1 мл) : RvE1 (1 мкг на мышь) (●), антитело 2G1 (10 мкг на мышь) (□) или контрольное изотипическое антитело (x). А. PMN, пронумерованные в течение первых 50 часов после инъекции зимозана А. В. Количество макрофагов в течение первых 50 часов после инъекции зимозана А. С. Индекс разрешения.

Фиг. 8. Влияние анти-СМКLR1 антитела на модель опухоли молочной железы 4Т1. Мышам инокулировали клетки 4Т1 (0,25 млн) в молочную железу. Затем анти-СМКLR1 антитело (2G1) (А. □ В. ●) или анти-41ВВ антитело (3Н3) (●) или оба антитела (▲) вводили дважды на 4-й и 7-й день (10 мкг/инъекцию) или контрольное антитело (клон антитела изотипа IgG1 3G8) (x А. и В.) вводили три раза в неделю в течение трех недель. А. Площадь опухоли измеряли через 8 дней после введения опухоли, а затем каждые 2 дня. В. Метастазирование опухоли в легкие измеряли с помощью биолюминесцентной визуализации (BLI) у животных, получавших изотипический контроль и анти-СМКLR1 антитело (n=4).

Фиг. 9. Эффект анти-СМКLR1 антитела на 2 различных моделях карциномы ободочной кишки у мышей. Были изучены две мышинные модели, и животные получали

контрольное изотипическое антитело (3G8) (x) или анти-СМКLR1 (2G1) (□) в дозе 20 мкг/инъекцию внутривенно в течение 3 недель. А-С. Результаты на модели карциномы ободочной кишки СТ26, сравнивающие однократную терапию р84 (А) и 2G1 (В) с комбинированной терапией обоими антителами (С). D: Результаты на модели карциномы ободочной кишки МС38.

Фиг. 10. Экспрессия СМКLR1 в биоптатах пациентов с язвенным колитом (UC) или болезнью Крона до и после лечения анти-TNF α . x представляет контроли; □ представляет экспрессию СМКLR1 у пациента, отвечающего на лечение кортикостероидами и/или иммуносупрессивную терапию до лечения инфликсимабом; ■ представляет экспрессию СМКLR1 у пациентов, не отвечающих на лечение кортикостероидами и/или иммуносупрессивную терапию до лечения инфликсимабом; Δ представляет экспрессию СМКLR1 у пациента, отвечающего на лечение кортикостероидами и/или иммуносупрессивную терапию после лечения инфликсимабом; ▲ представляет экспрессию СМКLR1 у пациента, не отвечающего на лечение кортикостероидами и/или иммуносупрессивное терапию после лечения инфликсимабом. А. Экспрессия транскрипта СМКLR1 у пациентов с язвенным колитом до и после лечения инфликсимабом. В. Экспрессия транскрипта СМКLR1 у пациентов с болезнью Крона до и после лечения инфликсимабом в воспаленных биоптатах ободочной кишки.

Фиг. 11. Экспрессия СМКLR1 в биоптатах пациентов с UC до и после лечения анти- $\alpha 4\beta 7$ (VDZ). А. Представляет экспрессию транскрипта СМКLR1 (СМКLR1) у пациентов с язвенным колитом до и после лечения ведолизумабом в биоптатах воспаленной ободочной кишки. R соответствует пациенту, отвечающему на лечение VDZ, NR соответствует пациенту, не отвечающему на терапию VDZ.

Фиг. 12. Анализ связывания анти-СМКLR1 антитела с пептидом СМКLR1 с помощью ELISA. Связывание антитела 2G1 (□) с петлей СМКLR1 EL3 (SEQ ID No: 18) сравнивали с изотипическим контрольным антителом (3G8) (x) путем измерения оптической плотности при 450 нм с помощью ELISA.

Фиг. 13. Изучение экспрессии СМКLR1 на различных клеточных линиях с помощью FACS и вестерн-блоттинга. А. Экспрессию белка на клеточной поверхности СМКLR1 определяли с использованием антитела 2G1 в различных концентрациях (нг/мл) на двух разных Т-клеточных линиях человека Thp1 и U937. В. Экспрессию белка СМКLR1 тестировали вестерн-блоттингом на линиях Т-клеток (Thp1 и U937), линии клеток фибробластов MRC5, линиях NK-клеток NKL и отрицательных и трансдуцированных клетках CHO для СМКLR1.

Фиг. 14. Экспрессия СМКLR1 на миелоидных клетках мышей с помощью FACS.

После дифференцировки мышинные клетки миелоидного происхождения анализировали на экспрессию CMKLR1 на клеточной поверхности. А. Экспрессия на моноцитах макрофагах (M0). Экспрессия В и С на макрофагах (провоспалительные макрофаги mM1 и макрофаги mM2, способствующие разрешению). Экспрессия D и E на дендритных клетках (mDC и iDC).

Фиг. 15. Экспрессия CMKLR1 на моноцитах человека и клетках костного мозга мышей, стимулированных провоспалительными стимулами.

Через 16 или 48 часов стимуляции клеток с помощью LPS, TNF α или IL6 экспрессию CMKLR1 (ChemR23) измеряли с помощью FACS. А. Результаты на моноцитах крови человека, В. и С. Результаты на миелоидных и нейтрофильных клетках из костного мозга мышей.

Фиг. 16. Изучение маркеров активации миелоидных клеток после активации пути CMKLR1. Дендритные клетки, инкубированные в эксципиенте, RvE1, 2G1 или изотипическом контроле (hIgG1), затем окрашивали для анализа FACS маркерными антителами: А. CD80-PE. В. CD86-FITC. С. CD103-PerCPy5.5. D. CD40-PerCy7. E. I/Ab-APC. Среднее значение флуоресценции определяли в каждом состоянии.

Фиг. 17. Изучение активации пути CMKLR1: фосфорилирование Akt и Erk. Вестерн-блот анализ пути активации ERK и АКТ через 5, 10 и 30 минут мышинных провоспалительных (M1) макрофагов, инкубированных с 2G1 или RvE1. Фосфорилированный белок Akt или Erk оценивали с использованием антитела P-Akt или антитела P-Erk (p44/42). А. Активация Erk и Akt с помощью RvE1. В. Активация Erk и Akt с помощью 2G1.

Фиг. 18. Конкурентное исследование взаимодействия хемерина-CMKLR1 с анти-CMKLR1 антителами.

А. Ингибирование цАМФ хемерином от двух разных поставщиков тестировали в DiscoverX (●) или R&D System (▲) или в комбинации с анти-CMKLR1 антителом (2G1) отдельно (◇) или в комбинации с хемерином из DiscoverX (□).

В. Активация бета-аррестина в присутствии анти-CMKLR1 антитела в различных концентрациях от 1 мкМ до 1 нМ и хемерина 2 нМ (◇) или 6 нМ (●)

Фиг. 19. Эффект анти-CMKLR1 антитела в мышинной модели хронического колита с переносом CD45Rb^{high} Т-клеток. А. Изменение массы получивших терапию животных отслеживали до шестидесяти дней. Животным вводили контрольный изотип hIgG1 (x) или анти-CMKLR1 антитело (■). В. Гистологическое окрашивание ткани толстой кишки у мышей, получивших анти-CMKLR1 (справа), по сравнению с контролем (слева). С. Показатели анатомической патологии, используемые для расчета тяжести патологии и

воспаления (оценка воспаления, оценка васкулита, толщина ободочной кишки и фиброзная стенка ободочной кишки). D. Инфильтрация CD3 и Ly6G.

Фиг. 20. Эффект анти-СМКLR1 антитела на модели мышей с гепатокарциномой (модель НСС). Противоопухолевый эффект внутрибрюшинного введения анти-СМКLR1 антитела (2G1, 0,8 мг/кг) три раза в неделю в течение 2 недель в комбинации (▲) или без (●) двух инъекций на 4 и 8 день анти-PD1 mAb (клон RMP1-14, 8 мг/кг) или с инъекциями (два раза в неделю) анти-PD-1 антитела отдельно (Δ). Мышей обрабатывали в течение 2 недель в ортотропной модели мышью гепатомы ($2,5 \cdot 10^6$ клеток Нера 1,6, инъецированных через воротную вену в день 0). Контрольное изотипическое антитело использовали в дозе 0,8 мг/кг три раза в неделю в течение 2 недель. Реакцию мышей считали частичной (PR), когда мыши выживали от нескольких дней до 1 месяца после прекращения терапии, или полной (CR), когда мыши выживали более 1 месяца, или вылечивались, когда они выживали в три раза дольше, чем время, необходимое для смерти всех контрольных мышей.

Фиг. 21. Продуцирование анти-СМКLR1-антитела в различных клеточных линиях.

CDR тяжелой цепи 2G1 были привиты в каркас трех человеческих зародышевых линий, названных IGHV3-23*04, IGHV1-46*01 и IGHV7-4-1 (номенклатура IMGT). CDR легкой цепи 2G1 были пересажены в каркас трех зародышевых линий человека, названных IGKV1-13*02, IGKV6-21*01 и IGKV3-11*01 (номенклатура IMGT). Каждую последовательность объединяли с константным фрагментом иммуноглобулина человека и совместно трансфицировали в клетки млекопитающих с получением гуманизированного антитела в клетках COS и CHO. Продуцирование оценивали в надосадочной жидкости. VH WT и VL WT соответствуют тяжелой и легкой цепям антитела 2G1, соответственно.

Фиг. 22. Продуцирование гуманизированного антитела, полученного из 2G1.

Концентрация и выход продуцирования различных комбинаций переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи в клетках CHO. VH WT и VL WT соответствуют переменным доменам антитела 2G1. Зародышевую линию получают из гуманизированной версии переменных доменов 2G1, и они раскрыты в данном документе ниже в примерах.

Фиг. 23. Распознавание связывания пептида C7 гуманизированным анти-СМКLR1 антителом, полученным из 2G1. Связывание C7biot в надосадочной жидкости клеток CHO, трансфицированных различными комбинациями тяжелых и легких цепей (VHWT+VLWT: комбинация SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 49; HCLC: комбинация SEQ ID No. 42 и SEQ ID No.52; HDLC: комбинация SEQ ID No. 43 и SEQ ID No. 52; HCLD: комбинация SEQ ID No. 42 и SEQ ID No. 53; HDLD: комбинация SEQ ID No. 43 и SEQ ID

№. 53).

Фиг. 24. ED50 анти-СМКLR1, полученного из антитела 2G1. 2G1wt: HALA: комбинация SEQ ID No. 41 и SEQ ID No. 50; комбинация SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 49; HCLC: комбинация SEQ ID No. 42 и SEQ ID No. 52; HDLC: комбинация SEQ ID No.43 и SEQ ID No.52; HCLD: комбинация SEQ ID No.42 и SEQ ID No.53; HDLD: комбинация SEQ ID No. 43 и SEQ ID No. 53.

Фиг. 25. Ингибирование экспрессии CCR7 на клетках макрофагов M1 *in vitro* с покрытием анти-ChemR23 антителами. 2G1 и все гуманизированные варианты 2G1 (HALA, HCLC, HCLD, HDLC и HDLD) иммобилизовали на планшете. Изотипический контроль добавляли в качестве контроля. Также были добавлены два изотипа, которые предотвращают связывание Fc γ , т.е. 2G1-N297A (2G1wt, мутированный в N297A для уменьшения связывания Fc γ R), и 2G4 (wt с изотипом IgG4, мутированным в S228P для стабилизации шарнирной области). Провоспалительные макрофаги M1 добавляли на планшет с покрытием на 48 часов, и экспрессию CCR7 на поверхности макрофагов измеряли с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 26. Апоптоз нейтрофилов. А) Выживаемость/смертность нейтрофилов В) Экспрессия каспазы-3 С) Продуцирование ROS.

Нейтрофилы выделяли из крови здоровых добровольцев и культивировали в течение 24 часов (анализ смертности), или 4 часов, 6 часов, 11 часов (анализ каспазы-3) или 5 часов (анализ ROS) на покрытом Iso-контроле (перекрестном), химерным анти-ChemR23 2G1 (квадрат) или различными гуманизированными версиями 2G1 (ромбы). Летальность PMN анализировали путем инкубации PMN со специфическими маркерами смертности и жизнеспособности, а затем подсчитывали с помощью анализа изображений. Каспазу-3 выявляли вестерн-блоттингом, интенсивность сигналов определяли с помощью программного обеспечения. Продуцирование ROS выявляли специфическим маркером и анализировали на изображениях.

Фиг. 27. Апоптоз нейтрофилов *in vivo* - А) Экспериментальные работы - В) Экспрессия ChemR23 С) частота нейтрофилов в экссудате D) частота макрофагов в экссудате E) смертность нейтрофилов F) соотношение мертвых/живых нейтрофилов.

Стерильный воздух вводили дважды в день 3 и день 6, и инициировали воспаление введением каррагинана. Экссудаты собирали в разное время и окрашивали для анализа проточной цитометрией.

Фиг. 28. Коэффициент трансмиграции нейтрофилов – А) Коэффициент трансмиграции PMN у здоровых пациентов – В) Коэффициент трансмиграции PMN у пациентов с воспалением, страдающих ANCA.

Эндотелиальные клетки покрывали и +/- активировали с помощью 100 ЕД/мл TNF α в течение ночи. Затем добавляли PMN с или без TNF α в концентрации 100 ЕД/мл и Ab на два часа. Трансмигрированные PMN собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 29. Экспрессия CD62L. PMN от здоровых добровольцев инкубировали в культуральной среде с покрытыми антителами в концентрации 10 мкг/мл в течение разного времени и собирали для окрашивания CD62L, анализировали с помощью проточной цитометрии (левая панель). Растворимая форма CD62L, высвобождаемая в результате слушивания, обнаруживается с помощью ELISA в надосадочной жидкости PMN, инкубированных с Ab, использованными в качестве покрытия (правая панель).

Фиг. 30. Модель мезотелиомы Выживаемость

Клетки АК-7 (3М) вводили в плевральную полость, и мыши получали либо изотипический контроль, либо 2G1 три раза в неделю в течение 3 недель, начиная с d4 в дозе 1 мг/кг.

Фиг. 31. Модель CRC А) Модель CRC с инокулированными опухолевыми клетками: развитие опухоли и выживаемость В) CRC, химически индуцированный CRC и CRC, индуцированный воспалительными процессами.

Инокуляцию опухоли проводили подкожно 0,5 М клеточной линии CRC MC38. Мышам инъецировали три раза в неделю 1 мг/кг 2G1 или Ctrl Ab в течение 3 недель, начиная с дня 4 после индукции опухоли. Циклофосфан вводили однократно по 100 мг/кг внутрибрюшинно. Развитие опухоли оценивали три раза в неделю и строили кривые выживаемости, когда у мышей развивалась опухоль > 1000 мм³.

В модели AOM-DSS мышам внутрибрюшинно вводили азоксиметан в дозе 7,5 мг/кг, а через 5 дней начинали три цикла: 5 дней-DSS и 14 дней-воду. Терапию или плацебо вводили после 1-го цикла и продолжали до конца два раза в неделю. Мышей взвешивали и анализировали стул два раза в неделю. Колонки и опухоли измеряли и нумеровали через 80 дней после химической инъекции.

Фиг. 32. Экспериментальная модель аутоиммунного энцефаломиелита. – А) Изменение массы в зависимости от времени В) Оценка болезни

Поражения в центральной нервной системе индуцировали введением иммуногенного пептида MOG в сочетании с адьювантами. Лечение (2G1) или изотипический контроль вводили в дозе 1 мг/кг, когда у животных клиническая оценка равнялась 2, что означает, что центральная нервная система уже поражена активностью Т-клеток, до конца эксперимента.

Фиг. 33. Связывание очищенных антител с пептидом ChemR23 человека с

помощью анализа ELISA (A) с концентрацией ED50 (нг/мл) (B). Для анализа активности ELISA ослиные антитела против IgG человека, специфичные к Fc (Jackson ImmunoResearch; США; ссылка 709-005-098) иммобилизовали на пластике в концентрации 1,3 мкг/мл в боратном буфере (pH9) и добавляли очищенное антитело для измерения связывания в буфере с 1% BSA по сравнению с 2G1 дикого типа. После инкубации и промывки добавляли биотинилированный антигенспецифический пептид (пептид Biot-C7), затем пероксидазу-стрептавидин (Jackson ImmunoResearch; США; ссылка 016-030-084) и выявляли обычными способами.

Фиг. 34-А. Связывание очищенных антител, инкубированных в течение 7 дней при 4°C или 37°C в анализе ELISA ChemR23 человека. В. Профиль SEC с помощью гель-фильтрационной хроматографии очищенных антител, инкубированных в течение 7 дней при 37°C. Каждое очищенное гуманизованное анти-ChemR23 антитело (HALA, HDLD, HD-LDT52S, HEF-LDT52S, HEF-LEF) инкубировали в течение 7 дней при 4°C или 37°C. Через 7 дней связывание очищенных антител анализировали с помощью ELISA, а образование агрегатов анализировали с помощью гель-фильтрации (Superdex 200 10/300GL, GeHealthcare).

Фиг. 35. Ингибирование экспрессии CCR7 на клетках макрофагов M1 *in vitro* с помощью анти-ChemR23 антитела, использованного в качестве покрытия. Гуманизованный вариант 2G1, HEF-LD-T52S, иммобилизовали на планшете. Изотипический контроль добавляли в качестве контроля. Провоспалительные макрофаги M1 добавляли на планшет с покрытием, и экспрессию CCR7 на поверхности макрофагов измеряли с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 36. Увеличение количества мертвых нейтрофилов PMN *in vitro* с помощью анти-ChemR23 антитела, использованного в качестве покрытия. PMN от здоровых добровольцев инкубировали в культуральной среде с вариантами антител HEF-LDT52S, HEF-LEF и HDLD, использованных в качестве покрытия, в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 часов и окрашивали с помощью набора «мертвые/живые» (LIVE/DEAD (Invitrogen)). Процент положительных клеток был получен путем анализа изображений с помощью программного обеспечения Fiji. В качестве контроля добавляли изотипический контроль. Также была добавлена мутированная версия антитела HEF-LDT52S, которая не связывается с Fc-рецепторами (FcR) (HEF-LDT52S N297A).

Примеры

Получение и отбор анти-CMKLR1 антитела

Было синтезировано несколько антител, имеющих различные последовательности CDR в их переменных доменах тяжелой и легкой цепей. Различные антитела

тестировали на их способность индуцировать созревание и дифференцировку дендритных клеток в направлении провоспалительного пути или противовоспалительного пути. Они отбирали антитело 2G1 (SEQ ID No: 37 и SEQ ID No: 49) для оценки его свойств в отношении статуса разрешения воспаления, по меньшей мере, влияния на указанный статус в фазе разрешения, и получения 3 зародышевых линий для оценки продуцирования антител *in vitro*.

Как показано на фиг. 1; антитела 2G1 и 1G1 (другое синтетическое антитело) были способны ингибировать активацию и/или созревание дендритных клеток более сильным образом, чем клетки других синтезированных антител (3G1 и 4G1) в направлении провоспалительного пути, поскольку уровень детекции дендритных клеток, экспрессирующих CD103 и IAb, обработанных с помощью 2G1, был ниже, чем у клеток DC, обработанные антителом C7 (способ, использованный в этом анализе, описан в пункте 10.2 Примеров). Как показано на фиг. 1E и 1F, жизнеспособность клеток повышается после обработки антителами 1G1 или 2G1 по сравнению с клетками, обработанными другими антителами, включая C7 или резолвин E1.

2G1 гуманизировали с использованием способа прививки CDR *in silico*, способа гуманизации. Полученные гуманизированные последовательности из областей CDR и FR, а также из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи описаны в таблицах ниже.

Таблица 1 Зародышевые линии вариабельного домена тяжелой цепи

Зародышевая линия	Аминокислотная последовательность	SEQ ID No.
VHJGHV3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLELVATINRYGGSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCPRLIYYGNEGDSWGQGLTVTVSS	41
VHJGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFTFSSYGMSWVRQAPGQGLELVATINRYGGSTYYPDSFKGRVTITRDNSTSTLYME LSSLRSED TAVYYCPRLIYYGNEGDSWGQGLTVTVSS	85
VHJGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKPGASVKV SCKASGFTFSSYGMSWVRQAPGQGLELVATINRYGGSTYYPDSFKGRFVISRDNSVSTLYLQIS SLKAEDTAVYYCPRLIYYGNEGDSWGQGLTVTVSS	86

Таблица 2. Зародышевые линии вариабельного домена легкой цепи

Зародышевая линия	Аминокислотная последовательность	SEQ ID No.
VL IGKV1-13*02	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSFMHWYQQKPGKAPKRWIYDTTKLTSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY YCQQWNSKPPLTFGGG TKVEIK	50
VLJGKV 6-21*01	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSFMHWYQQKPDQS PKRWIYDTTKLTSGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAAT YYCQQWNSKPPLTFGGG TKVEIK	87
VL IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSFMHWYQQKPGQA PRRWIYDTTKLTSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVY YCQQWNSKPPLTFGGG TKVEIK	88

Примеры терапевтической эффективности терапии анти-СМКLR1 антителами на доклинических моделях аутоиммунных и воспалительных заболеваний

Пример 1. Индукция колита с помощью DSS

Колит индуцировали у самцов мышей C57Bl/6 в возрасте 8-10 недель путем добавления 2% (масса/объем) DSS к стерильной питьевой воде *ad libitum* в течение 6 дней. Средства для терапии вводили внутривентрально: изотипический контроль hIgG1 (10 мкг на мышь), RvE1 (1 мкг на мышь) ежедневно или антитело 2G1 (10 мкг на мышь) три раза в течение 5 дней. Последующее наблюдение за колитом, состоящее из параметров массы тела и оценки стула (0: нормальный стул; 4: кровь в стуле), проводилось ежедневно. Когда мышей подвергали эвтаназии, измеряли длину ободочной кишки, отражающую тяжесть патологии. Индекс разрешения определялся в различных условиях, как описано в Bannenberg et al., 2005.

Результаты: Животная модель DSS, представленная на фиг. 2, представляет собой модель острого воспаления. На фиг. 1 показано лучшее общее состояние животных, получавших терапию анти-СМКLR1 антителом, чем состояние животных, получавших контрольное антитело или резолвин RvE1. Мыши, получившие терапию анти-СМКLR1, потеряли значительно меньше массы (фиг. 2A), а оценка стула (фиг. 2B) была значительно лучше. Что касается длины ободочной кишки и индекса разрешения (фиг. 2C и 2D), животные, получавшие анти-СМКLR1 или RvE1, продемонстрировали аналогичные результаты.

Пример 2. Индукция колита с помощью TNBS

Колит индуцировали у самцов мышей C57Bl/6 в возрасте 8-10 недель путем интравентральной инъекции 200 мкл гаптенирующего агента TNBS в концентрации 5% в 50% этаноле в день 0. Средства для терапии вводили внутривентрально; RvE1 (1 мкг на мышь) ежедневно в течение трех дней или антитело 2G1 (10 мкг на мышь) дважды в течение 3 дней. Последующее наблюдение за колитом, состоящее из параметров массы тела и оценки стула (0: нормальный стул; 4: кровь в стуле), проводилось ежедневно (данные не представлены). При эвтаназии мышей измеряли длину ободочной кишки, отражающую тяжесть патологии.

Результаты: Колит, вызванный TNBS, является еще одной моделью острого воспаления. На фиг. 3 показано, что у животных, получавших анти-СМКLR1 или RvE1, длина ободочной кишки такая же, как у нормальных животных (wt). Однако у тех, кому вводили изотипический контроль, длина ободочной кишки была короче. Эти результаты подтвердили терапевтический потенциал анти-СМКLR1 антитела, действующего подобно RvE1, на моделях острого воспаления у мышей.

Пример 3. Модель IL10-KO – Модель спонтанного колита

У мышей IL-10KO развивается спонтанный колит с 20-недельного возраста в основном из-за отсутствия регуляторной функции Т-клеток посредством секреции IL-10 в кишечнике. Мышей IL-10KO обследовали три раза в неделю, начиная с 18-недельного возраста, на предмет потери массы и консистенции стула, которые являются клиническими признаками этой патологии. Анти-СМКLR1 Антитело (2G1) или изотипический контроль (hIgG1) вводили внутривентриально, когда потеря массы превышала 5%, а оценка стула превышала или равнялась 1 в течение 2 недель (25 мкг/инъекция, 3 раза в неделю).

Результаты. Модель хронического воспаления использовалась для изучения эффективности терапии анти-СМКLR1 антителами. На фиг. 4 показан анализ процента потери массы (фиг. 4А) и оценки стула (фиг. 4В), когда животных лечили изотипическим контролем или анти-СМКLR1 антителом. Результаты показывают, что животные потеряли меньше массы при лечении анти-СМКLR1 антителом и имели лучший показатель стула, чем животные, получавшие изотипический контроль. Таким образом, анти-СМКLR1 антитело, по-видимому, обладает терапевтическим потенциалом при хронических воспалительных заболеваниях.

Пример 4. Доклиническая модель диабета 1 типа: модель на мышах NOD

8-недельных самок мышей NOD получали из лаборатории Charles River. У этих мышей развивается спонтанный диабет 1 типа в возрасте от 12 до 20 недель. Начало диабета можно определить по высокому уровню гликемии. Когда гликемия составляла от 180 до 234 мг/дл, анти-СМКLR1 и изотипический контроль вводили внутривентриально по 20 мкг/инъекцию три раза в неделю в течение 2 недель. Мышей подвергали эвтаназии, когда гликемия превышала 600 мг/дл, что соответствует необратимому диабету.

Результаты: эта модель диабета 1 типа также рассматривается как модель аутоиммунного заболевания у мышей. Результаты, представленные на фиг. 5 А-С, показывают, что животные, получавшие лечение анти-СМКLR1 антителом, демонстрировали лучший процент выживаемости и почти нормальную гликемию, что подтверждается измерением концентрации глюкозы в крови. Это выздоровление кажется стабильным во времени и указывает на потенциальное полное выздоровление животных, которые ранее были больны. Анти-СМКLR1 антитело восстанавливало состояние толерантности к глюкозе.

Пример 5. Индуцированное имиквимодом псориаз-подобное воспаление кожи

Крем Aldara®, который, как известно, вызывает псориаз у мышей, использовали на самцах мышей C57Bl/6 (в возрасте 8-10 недель). Мыши получали ежедневную местную

дозу Aldara. Средства для терапии (анти-СМКLR1 агонист или контрольное соединение) вводили внутривентриально:

Результаты: Анти-СМКLR1 агонист (2G1) уменьшает толщину кожи (фиг. 6А) после введения Aldara (см., например, на 15-й день), в то время как введение агониста не влияет на массу животных (фиг. 6В). Эти результаты предполагают возможность применения терапии соединением агониста против СМКLR1 на модели мышей с псориазом, что иллюстрирует аутоиммунное заболевание.

Пример 6. Терапевтическая эффективность анти-СМКLR1 антитела на доклинической модели сепсиса: модель перитонита у мышей

Обыкновенный перитонит вызывают внутривентриальной инъекцией Zymosan A® (1 мг на мышшь в 1 мл). Профилактическую инъекцию анти-СМКLR1 выполняли за 5 минут до инъекции Zymosan A: RvE1 (1 мкг на мышшь), антитело 2G1 (10 мкг на мышшь). Мышинные перитонеальные полиморфноядерные нейтрофилы (PMN) и макрофаги собирали через 2-4-8-16-24 и 48 часов после инъекции Zymosan A и подсчитывали с помощью анализа проточной цитометрией для определения индекса разрешения (Bannenberg et al., 2005).

Результаты: Результаты, представленные на фиг. 7 по количеству PMN (7А) и макрофагов (7В), а также по индексу разрешения (7С), показывают, что животные, получавшие RvE1 или анти-СМКLR1 антитело, продемонстрировали идентичные результаты и немного меньше клеток PMN и макрофагов вместе с лучшим индексом разрешения по сравнению с изотипическим контролем. При сепсисе даже небольшая разница может иметь значение для терапии. Следовательно, эти результаты очень позитивны в отношении потенциального применения анти-СМКLR1 антитела при сепсисе.

Пример 7. Терапевтическая эффективность лечения анти-СМКLR1 антителом на доклинических моделях онкологических заболеваний:

Пример 7.1. Влияние анти-СМКLR1 антитела на рост первичной опухоли и развитие ее метастазов в легкие на модели ортотопической карциномы молочной железы.

Мышей анестезировали 3% изофлураном. Мышей выбривали на животе и клетки 4Т1 (0,25 миллиона) вводили в молочную железу с помощью инсулинового шприца (30 калибра) в 50 мкл PBS. Анти-СМКLR1 антитело (2G1) или анти-41ВВ антитело (3Н3) или оба антитела вводили дважды на 4-й и 7-й день (10 мкг/инъекцию); контрольное антитело вводили три раза в неделю в течение трех недель внутривентриально в PBS (100 мкг/инъекцию). Во втором исследовании для измерения метастазов в легкие после развития карциномы молочной железы животных лечили анти-СМКLR1 антителом в дозе

0,8 мг/кг или контрольным антителом (100 мкг/инъекция) три раза в неделю в течение трех недель.

Результаты: Как показано на фиг. 8А, у животных, получавших одиночное соединение (2G1 или 3H3), не наблюдалось улучшения в росте опухоли по сравнению с животными, получавшими изотипическое контрольное антитело. Однако у животных, получавших комбинацию анти-СМКLR1-антитела и анти-41ВВ-антитела, наблюдается значительное ($p < 0,01$) снижение роста опухоли на модели карциномы молочной железы. Поскольку эта модель рака молочной железы является довольно агрессивной моделью, результаты считаются положительными. Как показано на фиг. 8В, которая иллюстрирует влияние анти-СМКLR1 соединения на метастазирование в легкие с помощью биолюминесцентной визуализации, можно видеть, что терапия анти-СМКLR1 снижает метастазирование в легкие по сравнению с животными, получавшими контрольное антитело. Анализ метастазов в лимфатических узлах показывает, что ни у одного животного, получавшего лечение анти-СМКLR1 соединением, не было метастазов, в то время как у двух животных в контроле были метастазы (данные не показаны). Эти результаты показывают, что анти-СМКLR1 антитело с агонистической активностью, имитирующей RvE1, оказывает антиметастатическое действие. В этой модели антитело по изобретению не проявляет какой-либо значительной эффективности в отношении развития первичной опухоли. Однако результаты показывают улучшение, когда животных обрабатывали комбинацией анти-СМКLR1 и анти-41ВВ антител.

Пример 7.2. Терапевтическое влияние на рост опухоли в модели карциномы ободочной кишки

8-недельных самцов мышей C57bl/6J анестезировали 3% изофлураном. Мышей выбривали на боку и инъецировали подкожно с помощью инсулинового шприца (30 калибра) клетки клеточной линии MC38 ($0,5 \cdot 10^6$ клеток/мышь) в 50 мкл PBS. Была использована другая модель, в которой самцов мышей Balb/c в возрасте 8 недель анестезировали 3% изофлураном. Мышей выбривали на боку и инъецировали подкожно с помощью инсулинового шприца (30 калибра) клетки CT26 ($1,10^6$ клеток/мышь) в 50 мкл PBS.

Агонистическое анти-СМКLR1 антитело (2G1) или анти-SIRPа антитело (p84-анти-SIRPа мыши от Merck Millipore) (SIRPа представляет собой новый ингибитор контрольной точки) вводили один раз в неделю (20 мкг/инъекцию) внутривентриально в течение 3 недель, начиная с d4 после инокуляции опухоли отдельно или в комбинации.

Результаты: Как показано на фиг. 9А-С, в модели карциномы CT26 анти-СМКLR1 антитело само по себе (фиг. 9В) не продемонстрировало клинического эффекта на

развитие опухоли по сравнению с контрольной группой, равно как и отдельное анти-SIRPа антитело (фиг. 9A). Однако неожиданно комбинация обоих соединений позволила своевременно ингибировать рост опухоли (фиг. 9C). В другой модели карциномы толстой кишки у мышей, представленной на фиг. 9D, анти-СМКLR1 антитело продемонстрировало эффективность в ингибировании роста опухоли по сравнению с изотипическим контролем. В совокупности эти результаты для двух разных моделей карциномы ободочной кишки показывают, что анти-СМКLR1 антитело-агонист может предотвращать развитие опухоли само по себе или в сочетании с другим терапевтическим агентом.

Пример 8. Мета-анализ экспрессии СМКLR1 в биоптатах пациентов-людей с UC или CD, получавших терапию анти-TNF α или анти- α 4 β 7 антителами.

Сигнальные сети, поддерживающие хроническое желудочно-кишечное воспаление при болезни Крона (Crohn's disease, CD) и язвенном колите (ulcerative colitis, UC), двух основных формах воспалительных заболеваний кишечника (inflammatory bowel disease, IBD), остаются неясными у человека. Согласно анализу почти 500 пациентов с IBD и 100 человек из контрольной группы, авторы изобретения сообщают, что транскрипт СМКLR1 накапливается в воспаленных тканях толстой кишки пациентов с тяжелым IBD, которые не реагировали на иммуносупрессивные/кортикостероидные и иммунотерапевтические средства, такие как терапия с помощью анти-TNF α (инфликсимаба) или анти-интегрин- α 4 β 7 (ведолизумаба).

Авторы изобретения сначала проанализировали экспрессию транскрипта СМКLR1 слизистой путем проведения метаанализа общедоступных наборов транскрипционных данных трех когорт пациентов с UC (GSE16879 (Arijs et al., 2009a) и GSE12251 (Arijs et al., 2009b) и GSE73661 с биопсией слизистой оболочки ободочной кишки, выполненная до терапии анти-TNF (в течение недели) у пациентов, невосприимчивых к кортикостероидам и/или иммуносупрессии. В этих трех когортах ответ анти-TNF определялся как гистологическое заживление, проанализированное через 4-6 недель после их первой инфузии анти-TNF (всего: n = 18 контролей без IBD, n = 41 неответивших с UC и n = 28 ответивших с UC).

Результаты: Анализ показал, что экспрессия транскрипта СМКLR1 значительно повышена в биоптатах ободочной кишки пациентов с первичным UC, не ответивших на лечение, до и после получения анти-TNF терапии по сравнению с контрольной группой без IBD или пациентами с UC до анти-TNF и теми, кто ответит на терапию с помощью анти-TNF (фиг. 10A). Экспрессия СМКLR1 в слизистой оболочке также значительно повышена в биоптатах ободочной или подвздошной кишки пациентов с болезнью Крона

(n = 24 контрольной группы без IBD, n = 17 пациентов с CD без ответа и n = 20 пациентов с болезнью Крона; GSE16879 (Arijs et al., 2009a)) до и после терапии анти-TNF у пациентов, которые не будут отвечать на анти-TNF, по сравнению с контролями без IBD или пациентами, которые будут отвечать (фиг. 10B). Наконец, анализ экспрессии генов слизистой оболочки ободочной кишки в когорте пациентов с UC (GSE7366146), получавших терапию анти- $\alpha 4\beta 7$ (ведолизумаб), также подтвердил, что экспрессия CMKLR1 также значительно увеличивается у пациентов, не ответивших на терапию, до и после лечения ведолизумабом (фиг. 11).

В целом метаанализ показывает, что CMKLR1 сверхэкспрессирован в воспаленных тканях пациентов с IBD, в частности, у пациентов, не отвечающих на текущую иммуносупрессивную терапию или иммунотерапию даже до начала лечения. Наш метаанализ предоставляет доказательства того, что экспрессия CMKLR1 в ободочной кишке или, скорее, в подвздошной кишке при CD у пациентов с UC или CD, которые не поддаются терапии, может, напротив, квалифицировать этих пациентов как отвечающих на терапию анти-CMKLR1 антителом-агонистом, таким как антитело изобретения.

Пример 9. Экспрессия CMKLR1 и исследование связывания антител
- ELISA, связывающий CMKLR1 (фиг. 12)

Пептид CMKLR1 (273NH2-PYHTLNLELNHTAMPGSVFSLGLPLATALAIA-COOH305) (SEQ ID No: 60) (5 мкг/мл) покрывали боратым буфером в течение ночи. Насыщение проводили с помощью PBS-Tween 0,1%-желатин 0,25% в течение 2 часов при 37°C. Затем добавляли антитела 2G1 или hIgG1 в различных концентрациях в течение 2 часов при 37°C. Затем добавляли вторичное антитело, конъюгированное с пероксидазой (0,8 мкг/мл), на 1 час при 37°C и выявляли субстратом TMB. Колориметрическую реакцию считывали с помощью TECAN.

- Экспрессия CMKLR1 с помощью FACS (фиг. 13A)

Клетки ресуспендировали в PBS-FBS-EDTA и инкубировали с блоком Fc (1/50) в течение 30 минут на льду. Окрашивание моноцитов, макрофагов и дендритных клеток проводили с использованием A488-меченого 2G1 (5 мкг) или A488-меченого hIgG1 (5 мкг).

- Вестерн-блот анализ CMKLR1 (фиг. 13B)

После миграции и переноса белка, как описано ранее, антитело 2G1 (10 мкг/мембрану) инкубировали в течение ночи при 4°C и выявляли с помощью вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой (1:2000). Затем экспрессию CMKLR1 определяли с помощью хемилюминесценции и ридера изображений. Изображения вестерн-блоттинга были количественно оценены с помощью программного обеспечения

Multi Gauge.

РЕЗУЛЬТАТЫ: результаты, представленные на фиг. 12, подтверждают, что клон анти-СМКLR1 антитела 2G1 способен связываться с полипептидом, образующим петлю EL3 из СМКLR1. Экспрессия СМКLR1 на различных клеточных линиях, оцененная с использованием антитела 2G1 с помощью FACS и вестерн-блоттинга, показала, что линии Trp1 и U937 опухолевых Т-клеток человека экспрессируют СМКLR1, а также трансдуцированные СМКLR1 клетки CHO и клеточную линию фибробластов легких человека MRC5 и клеточную линию NK человека NKL (фиг. 13).

Пример 10. Изучение экспрессии СМКLR1 в миелоидной линии.

Пример 10.1. Дифференцировка и поляризация моноцитов человека

Моноциты собирали из РВМС лейкоцитарной пленки здоровых добровольцев и выделяли магнитным разделением или элютриацией. Затем моноциты культивировали с различными смесями цитокинов для получения дифференцированных неполяризованных макрофагов или поляризованных макрофагов. Этот протокол позволял генерировать поляризованные дифференцированные макрофаги, чтобы иметь провоспалительные макрофаги (M1) или макрофаги, способствующие разрешению (M2), макрофагов воспаления в разных лунках. Моноциты высевали при концентрации $0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл в полной RPMI (RPMI с 10% FBS, 1% глутамина, 1% антибиотиков) и 500 мкл клеточной суспензии высевали на лунку в 24-луночный планшет. 100 нг/мл M-CSF добавляли к среде для дифференцировки клеток. Клетки инкубировали в течение 5 дней, а среду заменяли свежей средой, дополненной 100 нг/мл M-CSF, на 3-й день. Для фаз поляризации раствор LPS-IFN γ в концентрации 100 нг/мл LPS и 20 нг/мл IFN γ , дополненный изотипическими контролями (mIgG1 или hIgG4) (2 мкг/мл) или анти-СМКLR1 антителами (2 мкг/мл) (2G1 или 2G4, H6, BZ332 или 84939) или с пептидом C15 (10 нМ) или RvE1 (10 нг/мл) в течение 3 дней для создания провоспалительных макрофагов. Провоспалительные макрофаги -IFN γ также могут быть получены путем добавления только IFN γ (20 нг/мл) в культуральную среду. Для поляризации макрофагов с высоким разрешением клетки инкубировали с IL-4 в концентрации 20 нг/мл. После дифференцировки и/или поляризации фенотип и высвобождение функциональных цитокинов/хемокинов изучали с помощью анализа FACS, ELISA и вестерн-блоттинга.

Пример 10.2. Выделение и дифференцировка мышинных макрофагов и DC

- Выделение мышинных макрофагов, полученных из костного мозга.

Клетки костного мозга собирали и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS, глутамина и антибиотиков, содержащих макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) в количестве 100 нг/мл, в течение 5 дней,

индуцируя дифференцировку макрофагов. Макрофаги собирали и культивировали в течение 2 дней с IFN γ (20 нг/мл) и LPS (100 нг/мл), индуцирующими провоспалительную поляризацию, или с IL-4 (20 нг/мл), индуцирующими поляризацию, способствующих разрешению. Обработки добавляли во время поляризации макрофагов в дозе 2 мкг/мл.

- Получение дендритных клеток, происходящих из костного мозга.

Клетки костного мозга собирали и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS, глутамина и антибиотиков, а дифференцировку дендритных клеток индуцировали GM-CSF при 20 нг/мл в течение 7 дней. Затем собирали незрелые дендритные клетки (iDC) и культивировали в течение 24 часов с LPS (100 нг/мл), чтобы вызвать созревание iDC в mDC. Обработки добавляли во время дифференцировки и созревания в дозе 2 мкг/мл.

После дифференцировки мышинных провоспалительных макрофагов или макрофагов, способствующих разрешению, как описано выше, клетки инкубировали в присутствии среды, изотипического контроля, анти-СМКLR1 антител: использовали клоны H6 и BZ194, пептиды C15, 2G1, анти-СМКLR1 антитела, представляющего интерес, или RvE1. Затем с помощью ELISA оценивали секрецию IL10, CCL17 и IL12p40. Секрецию цитокинов измеряли в надосадочной жидкости с использованием набора ELISA от BD. Надосадочные жидкости разводили в соотношении 1/10 для цитокинов IL10, 1/50 - для цитокинов CCL17 и 1/100 - для цитокинов IL12p40.

- Исследование секреции цитокинов с помощью ELISA

Секрецию цитокинов определяли с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя BD. Вкратце, надосадочные жидкости разводили в соответствующем буфере и инкубировали в течение 2 часов после ночного покрытия захватывающим антителом и насыщения. Затем цитокины выявляли с помощью детектирующего антитела, связанного с биотином, и сигнал усиливали с помощью пероксидазной системы, связанной с биотином и стрептавидином. ТМВ, поставляемый BD Bioscience, использовали в качестве субстрата, и колориметрическую реакцию считывали с помощью TECAN.

- Маркеры клеток активации, проанализированные с помощью FACS

Дендритные клетки ресуспендировали в PBS-FBS-EDTA и инкубировали с живыми и мертвыми (LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stains Yellow-Life Technologies) в течение 30 минут на льду. Выполняли окрашивание CD11c-BV711, CD11b-APCCy7, I/Ab-APC, CD103-PerCPCy5.5, CCR7-V450, CD40-PeCy7, CD80-PE, CD86-FITC (все предоставлены BD Pharmingen).

- Вестерн-блот анализ ERK/Akt

Мышинные провоспалительные макрофаги (M1) были получены из костного мозга с помощью M-CSF и поляризованы с помощью IFN-гамма (IFNg) и LPS. Вкратце, клетки костного мозга собирали путем промывания бедренной кости и культивировали с 100 нг/мл mM-CSF в течение 5 дней, а затем поляризовали с 20 нг/мл IFNg и 100 нг/мл LPS в течение 24 часов. Затем их лишали FBS на 24 часа в среде RPMI с 2% FBS. Наконец, провоспалительные макрофаги мышей обрабатывали 2 мкг/мл антитела 2G1 в разное время: 5, 10 и 30 минут. Клетки собирали в буфер RIPA. Концентрацию белка измеряли с помощью набора для анализа белка BCA. Белки денатурировали нагреванием при 95°C в течение 5 минут и разводили в DTT и растворе Лэммли. После миграции и переноса, нитроцеллюлозную мембрану блокировали 5% BSA в TBS-T в течение 2 часов. Антитело к фосфо-ERK и антитело к фосфо-Akt (1:1000) инкубировали с мембраной в течение ночи при 4°C и выявляли с помощью вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой (1:2000). Вестерн-блоттинг. Изображения были количественно оценены с помощью программного обеспечения Multi Gauge.

Пример 10.3. Экспрессия CMLKR1 после воспалительных стимулов на моноцитах крови человека и миелоидных и нейтрофильных клетках костного мозга мыши.

Моноциты человека собирали из PBMC лейкоцитарной пленки здоровых добровольцев и выделяли с помощью магнитным разделением или элютриацией. Затем моноциты (CD14-положительные клетки) культивировали в среде и обрабатывали различными провоспалительными стимулами в течение 16 часов или 48 часов: LPS (100 нг/мл) или TNF α (100 ЕД/мл) или IL6 (20 нг/мл).

Мышинные моноциты (CD11b⁺ Ly6G⁻SSC^{low}) и нейтрофилы (CD11b⁺ Ly6G⁺SSC^{low}) получали из клеток костного мозга, собранных и культивированных в среде RPMI с добавлением 10% FBS, глутамин и антибиотиков. Затем клетки культивировали в среде и обрабатывали различными провоспалительными стимулами в течение 16 часов или 48 часов: LPS (100 нг/мл), или TNF α (100 ед/мл), или IL6 (20 нг/мл).

Экспрессию CMLKR1 измеряли с помощью FACS с использованием коммерческих анти-CMKLR1 антител (человеческое анти-ChemR23: клон 84939 и мышиное анти-ChemR23: клон 477806).

Результаты: Анализ экспрессии CMKLR1 у мышей миелоидного происхождения, показанный на фиг. 14, выявил хорошую экспрессию белка на моноцитах и макрофагах, а также на дендритных клетках. На фиг. 15 проиллюстрирована экспрессия CMKLR1 на моноцитах человека и миелоидных и нейтрофильных клетках костного мозга мышей. Эта экспрессия явно увеличивается под действием воспалительных стимулов, таких как LPS, TNF α или IL6 (по меньшей мере, в два раза по сравнению с контролем через 48 часов),

подтверждая, что экспрессия CMKLR1 на линии миелоидных клеток и избыточная экспрессия во время воспаления могут представлять собой терапевтический подход к подавлению и/или индукции разрешения воспаления. Маркеры активации DC анализировали с помощью FACS, и результаты, представленные на фиг. 16, показывают сильное снижение экспрессии CD80, CD86, CD103, CD40 и IAb при обработке клеток липидом RvE1 или антителом 2G1 по сравнению с эксципиентом или изотипическим контролем. Эти результаты показывают, что антитело 2G1 так же активно в отношении пути CMKLR1 на DC, как и RVE1. Затем авторы проанализировали путь активации CMKLR1 на мышинных макрофагах с помощью вестерн-блоттинга. На фиг. 17 показано, что анти-CMKLR1 антитело 2G1 способно индуцировать активацию белков Akt и Erk через 10-30 минут инкубации. Эти результаты показывают, что антитело 2G1 способно проявлять свойство агониста в отношении рецептора CMKLR1, как и липид RvE1.

Пример 11. Конкурентное исследование хемерин-индуцированной активации CMKLR1 с помощью анти-CMKLR1 антитела

Способы

Конкурентный анализ для измерения рекрутирования хемерин-зависимого В-аррестина рецептором CMKLR1 в присутствии анти-CMKLR1 антитела:

За день до анализа клетки CHO-K1 CMKLR1 (Discover'X ref 93-0313E2) высевали в предварительно нагретый клеточный реагент, затем высевали в 96-луночный планшет по 100 мкл/лунку клеток (Discover'X ref 15-103) и инкубировали 48 часов при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. Анти-CMLKR1 антитело разводили (22X в 7-точечной серии 3-кратных разведений от 1 мкМ до 1 нМ) и клетки инкубировали 30 минут при 37°C с антителом. Затем клетки стимулировали хемерином (2 или 6 нМ) в соответствии с протоколом поставщика (Discover'x ref 92-1036) в течение 90 мин при 37°C. Люминесценцию измеряли после добавления рабочего раствора для детекции к клеткам с помощью планшетного ридера с 0,5 с интеграцией.

Измерение конкуренции анти-CMKLR1 антитела с хемерином при продуцировании AMPc рецептором CMKLR1:

За день до эксперимента клетки CHO-K1 CMKLR1 Gi (Discover'X ref 95-0080C2) высевали в предварительно нагретый клеточный реагент, затем высевали в 96-луночный планшет по 100 мкл/лунку клеток (Discover'X ref 15-103) и инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ в течение 24 часов.

Смесь агониста хемерина (6x в 7-точечной серии 3-кратных разведений от 10-7 мкМ до 10-10M) (Discover'x ref 92-1036 или 2324-CM-025 от R&D Systems) и форсколина (40 мкМ) (активатор цАМФ) (Discover'x ref 92-0005) добавляли к клеткам в течение 30

мин при 37°C; или клетки предварительно инкубировали в течение 30 минут при 37°C с анти-CMKLR1 антителом (серийное разведение: 6X в 7-точечной серии 3-кратных разведений от 1 мкМ до 1 нМ). Затем к клеткам добавляли смесь хемерин (2 нМ) + форсколин (60 нМ) на 30 мин при 37°C. Для обнаружения цАМФ, реагент антител и рабочий раствор для детекции цАМФ добавляли в планшет на 1 час при комнатной температуре, затем добавляли раствор А цАМФ и клетки инкубировали 3 часа при комнатной температуре в темноте. Биoluminesценцию считывали с помощью планшетного ридера с интеграцией 0,5 с.

Результаты. Чтобы проверить, является ли антитело по изобретению антагонистом активации CMKLR1, индуцированной хемерином, были проведены два анализа, и результаты представлены на фиг. 18. Индуцированное хемерином ингибирование форсколин-зависимого продуцирования цАМФ показано на фиг. 18А (черные кружки или белые квадраты); Анти-CMLKR1 антитело по изобретению не могло обратить вспять это ингибирование продуцирования (черные кружки или белые квадраты) по сравнению с контролем (серые ромбы). Индуцированная хемерином активация бета-аррестина, представленная на фиг. 18В, показывает, что анти-CMKLR1 антитело по изобретению существенно не модифицирует хемерин-зависимую активацию бета-аррестина (белые кружки по сравнению с черными ромбами). Антитела по изобретению не обладают антагонистической активностью взаимодействия CMLKR1-Хемерин. Кроме того, антитела по изобретению не способны индуцировать хемерин-индуцированный сигнальный путь CMKLR1, подтверждая, что эти антитела не являются агонистами хемерина пути CMLKR1.

Пример 12. Мышиная модель хронического колита с переносом CD45Rb^{high} Т-клеток

Способ: CD45Rb^{high} CD4 Т-клетки выделяли из селезенки наивных мышей и сортировали на ARIA FACS после отрицательного отбора CD4 Т-клеток магнитной сортировкой, затем инъецировали внутрибрюшинно по $0,5 \cdot 10^6$ клеток в 100 мкл PBS 6-недельным самкам нокаутных мышей Rag1. Анти-CMKLR1 антитело (2G1) или изотипический контроль вводили с 32-го дня после переноса CD45Rb^{high} CD4 Т-клеток в течение 3 недель три раза в неделю в дозе 1 мг/кг. Последующее наблюдение за массой проводили три раза в неделю, и определяли изменение массы по сравнению с исходной массой. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результаты. На фиг. 19 представлен процент изменения массы в зависимости от времени у животных, получавших анти-CMLKR1 антитело или контрольный изотип. Обе группы, демонстрирующие одинаковое начальное изменение массы тела в течение первых

30 дней, получали анти-CMKLR1 антитело или изотипический контроль. Мыши, получавшие анти-CMKLR1, продолжали набирать массу, в то время как контрольные мыши, напротив, начинали терять массу, что указывает на развитие хронического колита, как и предполагалось в этой контрольной группе (фиг. 19А). У мышей, получавших анти-CMKLR1, наблюдали уменьшение толщины ткани, соответствующее репарации ободочной кишки. Также наблюдалось уменьшение фиброзной ткани (фиг. 19В). Различные баллы представляют собой баллы анатомической патологии, используемые для расчета тяжести патологии. Показатели, включающие показатели воспаления, были ниже у мышей, получавших анти-CMKLR1 (фиг. 19С). Авторы на третьей модели колита подтвердили, в данном документе на модели хронического воспаления, что анти-CMKLR1 антитела по изобретению могут представлять интерес для лечения хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как колит.

Пример 13. Противоопухолевое влияние на общую выживаемость в мышинной модели опухоли гепатокарциномы

Способ: Мышей анестезировали смесью ксилазина/кетамина. После лапаротомии опухолевые клетки Нера 1.6 вводили в PBS через воротную вену ($2,5 \cdot 10^6$ клеток/100 мкл) в PBS. Терапию начинали через 4 дня после инъекции опухоли. Анти-CMKLR1 антитело (клон 2G1) и изотипический контроль hIgG1 вводили в дозе 0,8 мг/кг три раза в неделю в течение 2 недель. Моноклональное анти-PD1 антитело вводили дважды в неделю в течение 2 недель внутривенно в PBS (8 мг/кг). Также тестировали комбинированные анти-CMKLR1 и анти-PD1 антитела (0,8 мг/кг и 8 мг/кг, соответственно). За общей выживаемостью следили в течение шестидесяти дней, и процент выживаемости в каждом состоянии был представлен на фиг. 22.

Результаты: Как показано на фиг. 20, у животных, получавших терапию анти-CMKLR1 или анти-PD1 антителами, уровень выживаемости увеличивался только для 1 животного на 7 получавших терапию (15% животных получавших терапию), что указывает на частичный ответ (PR). Однако терапия животных комбинацией анти-PD1 и анти-CMKLR1 антител позволяет значительно увеличить выживаемость (с 15% до 45%) у животных, которые остаются живыми через 60 дней после терапии, что указывает на полный ответ (complete response, CR). Этот результат указывает на неожиданную эффективность терапевтической комбинации (анти-PD1/антиCMKLR1 антитела) на модели опухоли НСС.

Пример 14. Продуцирование антител в различных клеточных линиях.

CDR тяжелой цепи 2G1 были пересажены в каркас трех зародышевых линий человека, названных IGHV3-23*04 (соответствует SEQ ID No. 41), IGHV1-46*01 и IGHV7-

4-1. CDR легкой цепи 2G1 были пересажены в каркас трех зародышевых линий человека, названных IGKV1-13*02 (соответствует SEQ ID No. 50), IGKV6-21*01 и IGKV3-11*01 (номенклатура IMGT). Каждую последовательность объединяли с константным фрагментом иммуноглобулина человека и совместно трансфицировали в клетки млекопитающих с получением гуманизированного антитела. Более подробно, для конструирования тяжелой цепи анти-ChemR23 A последовательности VH переменного домена антитела синтезировали и клонировали с помощью EcoRV в экспрессирующей плазмиде pFUSE-CHIg-hG1, содержащей Fc IgG1 человека (вектор pFUSE-CHIg-hG1 от Invivogen, Тулуза). Для конструирования легкой цепи антитела против ChemR23 синтезировали VL переменного домена и клонировали с помощью BsiWI в экспрессирующую плазмиду pFuse2CLIg-hk, содержащую CL-каппа человека (pFuse2CLIg-hk от Invivogen, Тулуза). В клетках НЕК или CHO млекопитающих мы котрансфицировали с помощью липофектамина плазмиды, содержащие VH-hFcG1, с плазмидой, содержащей VL-CLкаппа. После инкубации в течение 3-7 дней надосадочную жидкость извлекали и количественно определяли с помощью анализа сэндвич-ELISA. Надосадочную жидкость можно было очистить с помощью аффинной хроматографии на протеине А (HiTrap, GeHealthcare) с элюирующим буфером с 0,1 М лимонной кислотой, pH 3. Очищенное антитело подвергали диализу в PBS и концентрировали. Их количественно определяли с помощью УФ (A280 нм) и тестировали в анализе активности в отношении антиген-специфических пептидов C7.

Результаты. Как показано на фиг. 21, зародышевая линия человекаIGHV3-23*04 для тяжелой цепи была более эффективной для продуцирования антитела в клетках млекопитающих. Мутации, связанные с другой структурой, индуцировали менее продуктивные цепи. Что касается легкой цепи, зародышевая линия человека IGKV1-13*02 была лучшей для получения гуманизированного антитела, другая зародышевая линия снижала продуктивность на 1 log. Комбинация как гуманизированного IGHV3-23*04, так и IGKV1-13*02 подходит для получения с высоким выходом гуманизированных анти-СМКLR1 антител. Как показано на фиг. 22, эта комбинация действительно позволяет получать достаточное количество антител с удовлетворительным выходом.

Таким образом, для дальнейшей гуманизации антител были выбраны зародышевая линия IGHV3-23*04 и зародышевая линия IGKV1-13*02.

Несколько мутаций были добавлены в тяжелую цепь или легкую цепь. В тяжелой цепи мутации G33A (в CDR1), P60A (в CDR2), R94K (в FR3) были заменены для увеличения гуманизации, аминокислота D61 (в CDR2) могла быть заменена аминокислотой E или A для снижения риска дезаминирования антитела (вариант

последовательности vB-vD). В легкой цепи мутации S24R, S27Q, M33L (в CDR1), T51A (в CDR2), Y71F (в FR3) были заменены для повышения гуманизации, аминокислота N92 могла быть заменена на аминокислоту Q для снижения риска гликозилирования антитела (вариант последовательности vB-vD). Каждую последовательность объединяли с константным фрагментом иммуноглобулина человека и совместно трансфицировали в клетки млекопитающих с получением гуманизованного антитела. Результаты показали, что все комбинации тяжелых и легких цепей продуцируют антитела. Продуктивность, по-видимому, по-разному влияет на клетки млекопитающих в зависимости от комбинации тяжелых и легких цепей, но всегда в количестве, подходящем для эффективного продуцирования ввиду терапевтического применения антитела.

Пример 15. Способность к распознаванию анти-СМКLR1 антител, полученных *in vitro* и полученных из конкретных зародышевых линий переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи.

Для количественного анализа ELISA ослиные антитела против IgG человека, Fc-специфические (Jackson ImmunoResearch; США; ссылка 709-005-098) иммобилизовали на пластике в концентрации 1,3 мкг/мл в боратном буфере (pH9) и добавляли надосадочные жидкости, содержащие антитело, для измерения связывания, по сравнению со стандартным антителом. После инкубации и промывания добавляли мышинное антитело против каппа-цепи человека (Ose Immunotherapys, ссылка NaM76-5F3) и определяли с помощью меченого пероксидазой ослиного антитела против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch; США; ссылка 715-036-151). Проявление ELISA производили общепринятыми способами.

Для анализа активности ELISA ослиные антитела против IgG человека, специфичные к Fc (Jackson ImmunoResearch; США; ссылка 709-005-098) иммобилизовали на пластике в концентрации 1,3 мкг/мл в боратном буфере (pH9) и добавляли очищенное антитело для измерения связывания в буфере с 1% BSA по сравнению с 2G1 дикого типа. После инкубации и промывки биотинилированный антиген-специфический пептид (пептид Biot-C7: биотинилированный NH₂ - PYHTLNLELNHTAMPGSVFSLGLPLATALAIA -COOH, синтезированный synpeptide, SEQ ID No. 60), затем пероксидазу-стрептавидин (Jackson ImmunoResearch; США; ссылка 016-030-084) добавляли и выявляли обычными способами.

Комбинации тяжелых цепей и легких цепей, полученных из VHvAv3-23*04 (SEQ ID No. 41 - 89,8% гуманизации) и VLvAv1-13*01 (SEQ ID No. 50 - 82,1% гуманизации), давали гуманизованное антитело с хорошей связывающей активностью к антиген-специфическим пептидам (пептид C7), таким как антитело 2G1 дикого типа. Как показано

на фиг. 23 и комбинации цепей переменного домена гуманизированного антитела, полученных из 2G1 (для переменного домена тяжелой цепи: HA соответствует VHvAv3-23*04 и SEQ ID No. 4; HC соответствует SEQ ID No. 42; HD соответствует SEQ ID No. 43; для легкой переменной цепи: LA соответствует SEQ ID No. 50; LC соответствует SEQ ID No. 52; LD соответствует SEQ ID No. 53).

Все комбинации связывали антиген-специфические пептиды (пептид C7) по меньшей мере с такой же активностью, что и антитело 2G1 дикого типа. В некоторых случаях (сочетания HCLC, HCLD, HDLC и HDLD) связывание даже лучше, чем у антитела зародышевой линии HALA и антитела 2G1 дикого типа (фиг. 23). Как показано на фиг. 24, ED50 (нг/мл) гуманизированных антител по меньшей мере эквивалентна ED50 антитела 2G1 и в большинстве случаев лучше.

Пример 16. Биологическое влияние на интернализацию CCR7

Материалы и методы. Макрофаги получали из моноцитов здоровых добровольцев с 100 нг/мл M-CSF в течение 5 дней. Затем собирали макрофаги и инкубировали с покрытыми mAb в концентрации 10 мг/мл в присутствии 20 нг/мл IFN γ для получения воспалительных макрофагов M1. Затем M1 фенотипировали по CXCR4 и CCR7 с помощью проточной цитометрии, а цитокины, высвобождаемые в надосадочную жидкость, дозировали с помощью ELISA. Дендритные клетки были получены из моноцитов здоровых добровольцев с 50 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4 в течение 6 дней. Затем DC фенотипировали по CCR7 с помощью проточной цитометрии.

Полученные результаты. 2G1 и все гуманизированные варианты 2G1 (HALA, HCLC, HCLD, HDLC и HDLD) иммобилизовали на планшете. Изотипический контроль был добавлен в качестве контроля. Также были добавлены два изотипа, которые предотвращают связывание FcR γ , т.е. 2G1-N297A (2G1wt, мутированный в N297A для уменьшения связывания Fc γ R), и 2G4 (wt с изотипом IgG4, мутированным в S228P для стабилизации шарнирной области). Провоспалительные макрофаги M1 добавляли на планшет с покрытием на 48 часов, и экспрессию CCR7 на поверхности макрофагов измеряли с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 25, 2G1 и все гуманизированные варианты 2G1 были способны снижать экспрессию CCR7 на поверхности провоспалительных макрофагов (M1). Однако интернализация CCR7 не наблюдается с изотипом IgG1-N297A или IgG4, что предотвращает связывание FcR γ , что указывает на то, что изотип IgG1 был предпочтительным для получения этой биологической активности.

Пример 17. Апоптоз и гибель нейтрофилов

Нейтрофилы обычно располагаются в месте воспаления, и их присутствие

поддерживает воспалительный процесс, тем самым предотвращая иницирование или активную поддержку разрешения воспаления, что может привести к хроническому воспалению. Апоптоз нейтрофилов препятствует высвобождению гистотоксического содержимого нейтрофилов и оказывает противовоспалительное действие.

Как показано на фиг. 26А, соотношение жизни и гибели нейтрофилов выше в клетках, обработанных антителом по изобретению, что иллюстрирует эффект на эти клетки агониста по изобретению.

Экспрессия каспазы-3

Материалы и методы:

PMN от здоровых добровольцев инкубировали в культуральной среде с Ab, использованными в качестве покрытия в концентрации 10 мкг/мл в течение разного времени и собирали для окрашивания каспазы-3, после чего анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Интенсивность экспрессии каспазы-3 рассчитывали на WB.

Результаты: Как показано на фиг. 26В, введение агониста анти-СМКLR1 повышает активность каспазы-3 по сравнению с клетками, обработанными контрольным антителом. Антитело HALA оказывает более сильное влияние на активность каспазы 3 по сравнению с антителом 2G1. 2G1 WT и HALA увеличивают расщепление каспазы-3, что означает, что запуск ChemR23 приводит к каспаза-3-зависимому апоптозу.

Процент мертвых PMN и тест ROS (фиг. 26С):

PMN от здоровых добровольцев инкубировали в культуральной среде с Ab, использованных для покрытия, в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 или 5 часов и окрашивали либо с помощью набора «мертвые/жизнеспособные» (LIVE/DEAD (Invitrogen)) либо с помощью специфического маркера активных форм кислорода (ROS), соответственно. Процент положительных клеток был получен путем анализа изображений с помощью программного обеспечения ImageJ.

Результаты: 2G1 и все гуманизированные варианты 2G1 увеличивают смертность от PMN через 24 часа. Через 48 часов процент мертвых клеток, инкубированных с контролем IgG1 и вариантом HALA, был одинаковым, что указывает на то, что антитела, запуская передачу сигнала СМКLR1, только ускоряют запрограммированную гибель клеток в PMN. 2G1 и все гуманизированные варианты 2G1 ускоряют гибель PMN, поэтому гуманизированные варианты сохраняют свойства, способствующими разрешению. Варианты 2G1 и HALA увеличивают продуцирование ROS с помощью PMN через 5 часов.

Как показано на фиг. 27В, процент ChemR23-положительных клеток (макрофагов и нейтрофилов) увеличивается при индукции воспаления. Но процент нейтрофилов в

экссудате значительно не снижается у животных, получавших терапию анти-СМКLR1 антителом (фиг. 27С, черный квадрат), в то время как общий процент макрофагов в экссудате несколько увеличивается (фиг. 27D). Это свидетельствует о том, что введение агониста СМКLR1 не снижает общего количества миелоидных клеток в экссудате, а влияет на апоптоз нейтрофилов преимущественно в очаге воспаления. Как показано на фиг. 27Е и фиг. 27F, процент мертвых нейтрофилов увеличивается при введении агониста СМКLR1, а также их гибели. Эти результаты иллюстрируют положительный эффект агониста СМКLR1 для лечения замедления разрешения воспаления, поскольку воздействие на популяцию нейтрофилов происходит не в экссудате, а в месте воспаления.

В заключение необходимо отметить, что за исключением индуцированного апоптоза нейтрофилов в месте воспаления, лечение антителом по изобретению не приводит к апоптозу всей популяции нейтрофилов. Эта функция может быть полезной для уменьшения побочных эффектов.

Пример 18. Трансмиграция нейтрофилов

Нейтрофилы мигрируют после рекрутирования в очаг воспаления, тем самым инициируя, усиливая и/или поддерживая воспалительный процесс.

Материалы и методы

Эндотелиальные клетки человека (HDMEC) инкубировали в течение 24 часов в Transwell, покрытой желатином, и активировали в течение ночи TNF-альфа в концентрации 100 ЕД/мл или без воспалительных состояний. Затем PMN от здоровых добровольцев или пациентов с ANCA инкубировали в Transwell, содержащих монослой HDMEC, в течение 4 часов. Антитела (изотипический контроль и 2G1) добавляли в количестве 10 мкг/мл +/- TNF-альфа в количестве 100 ЕД/мл в течение 4 часов анализа трансмиграции. Собирали нижнюю часть трансмиграции Transwell и трансмигрировавшие PMN подсчитывали с помощью проточной цитометрии с использованием гранул для подсчета.

Результаты

Нейтрофилы, обработанные 2G1, имеют более низкую способность к трансмиграции по сравнению с клетками, обработанными контрольными соединениями (фиг. 28А). 2G1 предотвращает трансмиграцию PMN через монослой эндотелия, особенно в условиях воспаления, когда PMN и эндотелиальные клетки были активированы с помощью TNF α у здоровых добровольцев и у пациентов со СПИД (фиг. 28В).

Антитело по изобретению обладает способностью снижать способность нейтрофилов к трансмиграции.

Пример 19. Экспрессия CD62L

Материалы и методы. PMN от здоровых добровольцев инкубировали в культуральной среде с Ab, использованными в качестве покрытия, в концентрации 10 мкг/мл в течение разного времени и собирали для окрашивания CD62L, анализировали с помощью проточной цитометрии (фиг. 29, левая панель). Экспрессия CD62L на клеточной поверхности в клетках, инкубированных с антителом по изобретению, снижена по сравнению с клетками, инкубированными в отсутствие антитела. Растворимую форму CD62L, высвобождаемую в результате слущивания, обнаруживают с помощью ELISA в надосадочной жидкости PMN, инкубированного с антителами, использованными в качестве покрытия. Обработка PMN анти-ChemR23 антителом увеличивает концентрацию растворимого CD62L по сравнению с состоянием изотипического контроля (фиг. 29, правая панель).

Пример 20. Модель мезотелиомы Выживание

Мыши, получавшие терапию в соответствии со способом, поясненным в описании фигуры, с помощью агониста CMKLR1, имеют более высокую выживаемость, чем мыши, получавшие контрольное антитело, что иллюстрирует положительный эффект соединения по изобретению для лечения мезотелиомы (фиг. 30).

Пример 21. Модель CRC

Как показано на фиг. 31A, объем опухоли уменьшается у животных, получавших терапию анти-CMKLR1 антителом по изобретению, по сравнению с контрольным антителом. В некоторых случаях также наблюдается полная ремиссия, что свидетельствует о положительном эффекте соединения по изобретению для лечения CRC.

Более того, как показано на фиг. 31B, терапия моноклональным анти-CMKLR1 антителом (OSE-230) приводит к снижению оценки стула и уменьшению числа опухолей.

Пример 22. Экспериментальная модель аутоиммунного энцефаломиелита

В этой модели лечебное введение антитела по изобретению в модели EAE не приводит к снижению массы (фиг. 32A) по сравнению с животными, получавшими контрольное антитело. Но показатель болезни значительно снижается, когда терапию проводят анти-CMKLR1 антителом (фиг. 32B). Анти-CMKLR1 антитело приводит к значительному улучшению оценки болезни уже через десять дней после лечения по сравнению с контролем, поскольку оценка приблизительно на 30% ниже у животных, получавших соединение-агонист. Таким образом, показано, что терапия анти-CMKLR1 соединением является эффективной для лечения аутоиммунного энцефаломиелита.

Пример 23. Оптимизация аминокислотного остатка CDR

Несколько мутаций были добавлены в тяжелую цепь или легкую цепь варианта

HDLD для замены аминокислоты, связанной с иммуногенностью, спрогнозированной *in silico* с помощью программного обеспечения IEDB и программного обеспечения для прогнозирования HLA-II (способ NetMHCpanII).

Далее подчеркивается, что среди очень большого числа возможных мутаций аминокислот авторы изучили и идентифицировали некоторые очень выгодные мутации, которые не оказывают существенного и неадекватного влияния на биологическую активность продукта. Экспертиза приводит к отбору, описанному ниже.

В тяжелой цепи замены аминокислот D61E в CDR2 (HD-61E, SEQ ID NO: 89), R52G в CDR2 (HD-R52G, SEQ ID NO: 90) или R52aG, A49S, N52S и Y53S в CDR2 (HEF, SEQ ID NO: 91) снижали иммуногенность. В легкой цепи аминокислота N92 в CDR3 была заменена аминокислотой S (LD-N92S, SEQ ID NO: 92) или Q (LD-T52S, SEQ ID NO: 93) для предотвращения посттрансляционной модификации. T52S в CDR2 также была заменена для снижения иммуногенности в варианте LD-N92S. N92Q в CDR3 и T52S, T55E в CDR2 и W47L в каркасной области 2 были заменены для снижения иммуногенности в варианте LEF (SEQ ID NO: 55). Последовательности указаны в таблице ниже:

Таблица 3. Оптимизированные последовательности вариантов тяжелой и легкой цепи HDLD

HD-D61E: 2G1-VH-D61E_IGHV3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVATINRYGGSTYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCPKLIYYGNEGDSWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 89
HD-R52G: 2G1-VH-R52G-IGHV3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVATINGYGGSTYYAASVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCPKLIYYGNEGDSWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 90
HEF: 2G1-VHvEF_IGHV3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVSTISGSGSTYYAASVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCPKLIYYGNEGDSWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 91
LD-N92S: 2G1-VL _v D2-IGKV1-13*02	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSFLHWYQQKPGKAPKRWIYDASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSSKPPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 92
LD-T52S: 2G1-VL _v E-IGKV1-13*02	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSFLHWYQQKPGKAPKRWIYDASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWQSKPPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 93
LEF: 2G1-VL _v EF-IGKV1-13*02	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSFLHWYQQKPGKAPKRLIYDASKLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWQSKPPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 55

Как будет подробно показано в следующих примерах, среди всех возможных комбинаций, антитела, содержащие легкую цепь LDT52S и, в частности, вариант HEF-LDT52S, являются особенно предпочтительными. По сравнению с другими протестированными антителами HEF-LDT52S, оптимизированный для снижения иммуногенности, обладает высокой связывающей активностью и стабильностью при

сохранении биологических функций.

Каждую последовательность объединяли с константным фрагментом иммуноглобулина человека и совместно трансфицировали в клетки млекопитающих с получением гуманизированного антитела. Результаты показали, что все комбинации тяжелых и легких цепей продуцируют антитела. Продуктивность, по-видимому, по-разному влияет на клетки млекопитающих в зависимости от комбинации тяжелых и легких цепей, но всегда в количестве, подходящем для эффективного продуцирования ввиду терапевтического применения антитела.

Пример 24. Распознающая способность анти-СМКLR1 антител, полученных *in vitro*

Для анализа активности ELISA ослиные антитела против IgG человека, специфичные к Fc (Jackson Immunoresearch; США; ссылка 709-005-098) иммобилизовали на пластике в концентрации 1,3 мкг/мл в боратном буфере (pH9) и добавляли очищенное антитело для измерения связывания в буфере с 1% BSA по сравнению с 2G1 дикого типа. После инкубации и промывки биотинилированный антиген-специфический пептид (пептид Biot-C7: биотинилированный NH₂ - PYHTLNLLELNHTAMPGSVFSLGLPLATALAIA -COOH, синтезированный synpeptide, SEQ ID No. 60), затем пероксидазу-стрептавидин (Jackson Immunoresearch; США; ссылка 016-030-084) добавляли и выявляли обычными способами.

Как показано на фиг. 33, комбинации цепей переменных доменов гуманизированного антитела, происходящих из 2G1 (для тяжелого переменного домена: HD соответствует SEQ ID No. 43, а HEF соответствует SEQ ID NO: 91; для легкой переменной цепи: LD соответствует с SEQ ID No: 53; LD-T52S соответствует SEQ ID No: 93, а LEF соответствует SEQ ID NO: 55) генерировали гуманизированное антитело с лучшей связывающей активностью, чем антитело зародышевой линии HALA и антитело 2G1 дикого типа к антиген-специфическим пептидам (пептид C7).

Пример 25. Анализ стабильности

Каждое очищенное гуманизированное анти-ChemR23 антитело (HALA, HDLD, HD-LDT52S, HEF-LDT52S, HEF-LEF) инкубировали в течение 7 дней при 4°C или 37°C. Через 7 дней связывание очищенных антител анализировали с помощью ELISA, а образование агрегатов анализировали с помощью гель-фильтрации (Superdex 200 10/300GL, GeHealthcare).

Как показано на фиг. 34A, все очищенные антитела проявляли одинаковую связывающую активность при 37°C, 4°C или -80°C. Как показано на фиг. 34B, процент агрегата не изменился через 7 дней при 37°C для HDLD и HEF-LDT52S.

Пример 26. Биологическое влияние на интернализацию CCR7

Гуманизированный вариант 2G1, HEF-LD-T52S, иммобилизовали на планшете. В качестве контроля добавляли изотипический контроль. Провоспалительные макрофаги M1 добавляли на планшет с покрытием в течение 48 часов и измеряли экспрессию CCR7 на поверхности макрофагов с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 35, гуманизированный вариант 2G1, HEF-LD-T52S, был способен снижать экспрессию CCR7 на поверхности провоспалительных макрофагов (M1) по сравнению с изотипическим контролем. Гуманизированный вариант 2G1, HEF-LD-T52S, оптимизированный для снижения иммуногенности, сохранил функциональные свойства антитела 2G1.

Пример 27. Биологический эффект на жизнеспособность PMN

PMN от здоровых добровольцев инкубировали в культуральной среде с вариантами антител HEF-LDT52S, HEF-LEF и HDLD, использованных в качестве покрытия, в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 часов и окрашивали с помощью набора «мертвые/живые» (LIVE/DEAD (Invitrogen)). Процент положительных клеток был получен путем анализа изображений с помощью программного обеспечения Fiji. В качестве контроля добавляли изотипический контроль. Также была добавлена мутированная версия антитела HEF-LDT52S, которая не связывается с Fc-рецепторами (FcR) (HEF-LDT52S N297A). Как показано на фиг. 36, 2G1 и все гуманизированные варианты HEF-LDT52S, HEF-LEF и HDLD 2G1 ускоряют гибель PMN, и поэтому гуманизированные варианты сохраняют свойства, способствующие разрешению.

Гуманизированный вариант HEF-LDT52S был оптимизирован для снижения иммуногенности. Этот оптимизированный вариант сохраняет высокую связывающую активность и стабильность при сохранении биологических функций.

Список литературы

- Arijs, I., De Hertogh, G., Lemaire, K., Quintens, R., Van Lommel, L., Van Steen, K., Leemans, P., Cleynen, I., Van Assche, G., Vermeire, S., et al. (2009a). Mucosal gene expression of antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment. *PloS One* 4, e7984.
- Arijs, I., Li, K., Toedter, G., Quintens, R., Van Lommel, L., Van Steen, K., Leemans, P., De Hertogh, G., Lemaire, K., Ferrante, M., et al. (2009b). Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* 58, 1612–1619.
- Arijs, I., Hertogh, G.D., Lemmens, B., Lommel, L.V., Bruyn, M. de, Vanhove, W., Cleynen, I., Machiels, K., Ferrante, M., Schuit, F., et al. (2018). Effect of vedolizumab (anti- $\alpha 4\beta 7$ -integrin) therapy on histological healing and mucosal gene expression in patients with UC. *Gut* 67, 43–52.
- Bannenberg, G.L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K.H., Hong, S., and Serhan, C.N. (2005). Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 4345–4355.
- Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K., and Segal, D. (2007). Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology* 148, 4687–4694.
- Buckley, C.D., Gilroy, D.W., and Serhan, C.N. (2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* 40, 315–327.
- Cash, J.L., et al., 2008. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J. Exp. Med.* 205, 767–775
- Ernst, M.C., and Sinal, C.J. (2010). Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21, 660–667.
- Goralski, K.B., McCarthy, T.C., Hanniman, E.A., Zabel, B.A., Butcher, E.C., Parlee, S.D., Muruganandan, S., and Sinal, C.J. (2007). Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism. *J. Biol. Chem.* 282, 28175–28188.
- Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* 16, 539–548.
- Kaur, J., Adya, R., Tan, B.K., Chen, J., and Randeve, H.S. (2010). Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1762–1768.
- Peyrassol, X., Laeremans, T., Gouwy, M., Lahura, V., Debulpaep, M., Damme, J.V., Steyaert, J., Parmentier, M., and Langer, I. (2016). Development by Genetic Immunization of Monovalent Antibodies (Nanobodies) Behaving as Antagonists of the Human ChemR23

Receptor. *J. Immunol.* 196, 2893–2901.

Roh, S., Song, S.-H., Choi, K.-C., Katoh, K., Wittamer, V., Parmentier, M., and Sasaki, S. (2007). Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 1013–1018.

Samson, M., Edinger, A.L., Stordeur, P., Rucker, J., Verhasselt, V., Sharron, M., Govaerts, C., Mollereau, C., Vassart, G., Doms, R.W., et al. (1998). ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur. J. Immunol.* 28, 1689–1700.

Sell, H., Laurencikiene, J., Taube, A., Eckardt, K., Cramer, A., Horrigs, A., Arner, P., and Eckel, J. (2009). Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle Cells. *Diabetes* 58, 2731–2740.

Serhan, C.N. (2014a). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92–101.

Serhan, C.N. (2014b). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92–101.

Sulciner, M.L., Serhan, C.N., Gilligan, M.M., Mudge, D.K., Chang, J., Gartung, A., Lehner, K.A., Bielenberg, D.R., Schmidt, B., Dalli, J., et al. (2017). Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *J. Exp. Med.* jem.20170681.

Watts, S.W., Dorrance, A.M., Penfold, M.E., Rourke, J.L., Sinal, C.J., Seitz, B., Sullivan, T.J., Charvat, T.T., Thompson, J.M., Burnett, R., et al. (2013). Chemerin connects fat to arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1320–1328.

Wittamer, V., Franssen, J.-D., Vulcano, M., Mirjolet, J.-F., Poul, E.L., Migeotte, I., Brézillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., et al. (2003). Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. *J. Exp. Med.* 198, 977–985.

Zabel, B.A., Rott, A., and Butcher, E.C. (2015). Leukocyte chemoattractant receptors in human disease pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 10, 51–81.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против хемерин-подобного рецептора 1 (CMKLR1) или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с CMKLR1, в частности с CMKLR1 человека, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

а. переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий три CDR, VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, где:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 и SEQ ID No. 7; и

- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 61; и

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 и SEQ ID No. 16; и

б. переменный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий три CDR, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, где:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 23; и

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 33; и

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

2. Анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с третьей внеклеточной петлей (EL3) из CMKLR1, в частности с эпитопом, расположенным внутри третьей внеклеточной петли (EL3) из CMKLR1, или внутри полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID No: 2 или SEQ ID No. 59, или с эпитопом, расположенным в аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60.

3. Анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, которое представляет собой резолвин E1-подобный агонист CMKLR1, в частности, где анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает эффектом фактора, способствующего разрешению воспаления, в частности, обладает таким эффектом, взаимодействуя с миелоидной клеткой.

4. Анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что:

- VHCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 3 и SEQ ID No. 4; и/или
- VHCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 61; и/или

- VHCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 и SEQ ID No. 15.

5. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что:

- VLCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19 и SEQ ID No. 23, и/или

- VLCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27 и SEQ ID No. 33; и/или

- VLCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 36.

6. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, которое содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40 и SEQ ID No. 62.

7. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, которое содержит переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57 и SEQ ID No. 58.

8. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, которое содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40 и SEQ ID No. 62; и переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55 и SEQ ID No. 56.

9. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, которое содержит следующие CDR: VHCDR1 из SEQ ID No. 4; VHCDR2 из SEQ ID No. 12; VHCDR3 из SEQ ID No. 13, VLCDR1 из SEQ ID No. 19, VLCDR2 из SEQ ID No. 26 и VLCDR3 из SEQ ID No. 35.

10. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, которое содержит следующие каркасы: VHFR1 из SEQ ID No. 65, VHFR2 из SEQ ID No. 67, VHFR3 из SEQ ID No. 69., VHFR4 из SEQ ID No. 71, VLFR1 из SEQ ID No. 72,

VLFR2 из SEQ ID No. 73, VLFR3 из SEQ ID No. 76 и VLFR4 из SEQ ID No. 77.

11. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9 или 10, которое содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 91, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 93.

12. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11, которое не активирует сигнальный путь бета-аррестина в СМКLR1-положительных клетках *in vitro* и/или *in vivo*.

13. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, не проявляющее значительного истощения СМКLR1-положительных клеток *in vitro* и/или *in vivo*.

14. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, которое не конкурирует с хемерином за связывание с СМКLR1 и/или не препятствует связыванию хемерина с СМКLR1.

15. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, которое представляет собой гуманизованное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, где константный домен легкой цепи антитела получен из константного домена легкой цепи каппа человека, в частности, где константный домен легкой цепи содержит или состоит из последовательности SEQ ID No: 79, и где константный домен тяжелой цепи антитела получен из константного домена тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, в частности, где константный домен тяжелой цепи антитела содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 80, SEQ ID No. 81, SEQ ID No. 82, SEQ ID No. 83 или SEQ ID No. 84, в частности, из константного домена тяжелой цепи IgG1 человека, в частности, где константный домен тяжелой цепи антитела содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No:80 или SEQ ID No:83.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, выбранное из группы, состоящей из химерного, модифицированного и гуманизованного антитела, которое специфически связывается с СМКLR1, в частности СМКLR1 человека, которое содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий (i) VHCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID No:9, SEQ ID No:10, SEQ ID No:11, SEQ ID No:12 и SEQ ID No:61, и (ii) VHCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15 и SEQ ID No: 16, или ее мутантной последовательности, где аминокислотный(е) остаток(ки) заменен(ы) при условии, что

аминокислотные остатки в положениях 1 и 2 мутантной последовательности представляют собой, соответственно, L и I; и

где анти-СМКLR1 соединение специфически связывается с эпитопом, расположенным в пределах третьей внеклеточной петли (EL3) из СМКLR1, в частности, при этом соединение специфически связывается с полипептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 2 или SEQ ID No. 59 или с эпитопом, расположенным в аминокислотной последовательности SEQ ID No. 60; и

где указанное соединение конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, соответствующий SEQ ID No: 37, и переменный домен легкой цепи, соответствующий SEQ ID No: 49, за связывание с полипептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 2, или SEQ ID No. 59, или SEQ ID No. 60, или с полипептидом, содержащим или состоящим из третьей петли (EL3) внеклеточного домена СМКLR1.

17. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, которое содержит следующие CDR:

- VHCDR1 из SEQ ID No. 4;
- VHCDR2 из SEQ ID No. 12;
- VHCDR3 из SEQ ID No. 13,
- VLCDR1 из SEQ ID No. 19,
- VLCDR2 из SEQ ID No. 26, и
- VLCDR3 из SEQ ID No. 35.

18. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 16 или 17, которое содержит следующие каркасы: VHFR1 из SEQ ID No. 65, VHFR2 из SEQ ID No. 67, VHFR3 из SEQ ID No. 69., VHFR4 из SEQ ID No. 71, VLFR1 из SEQ ID No. 72, VLFR2 из SEQ ID No. 73, VLFR3 из SEQ ID No. 76 и VLFR4 из SEQ ID No. 77.

19. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, которое содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 91, и переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 93.

20. Анти-СМКLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19 для применения в профилактическом или терапевтическом лечении:

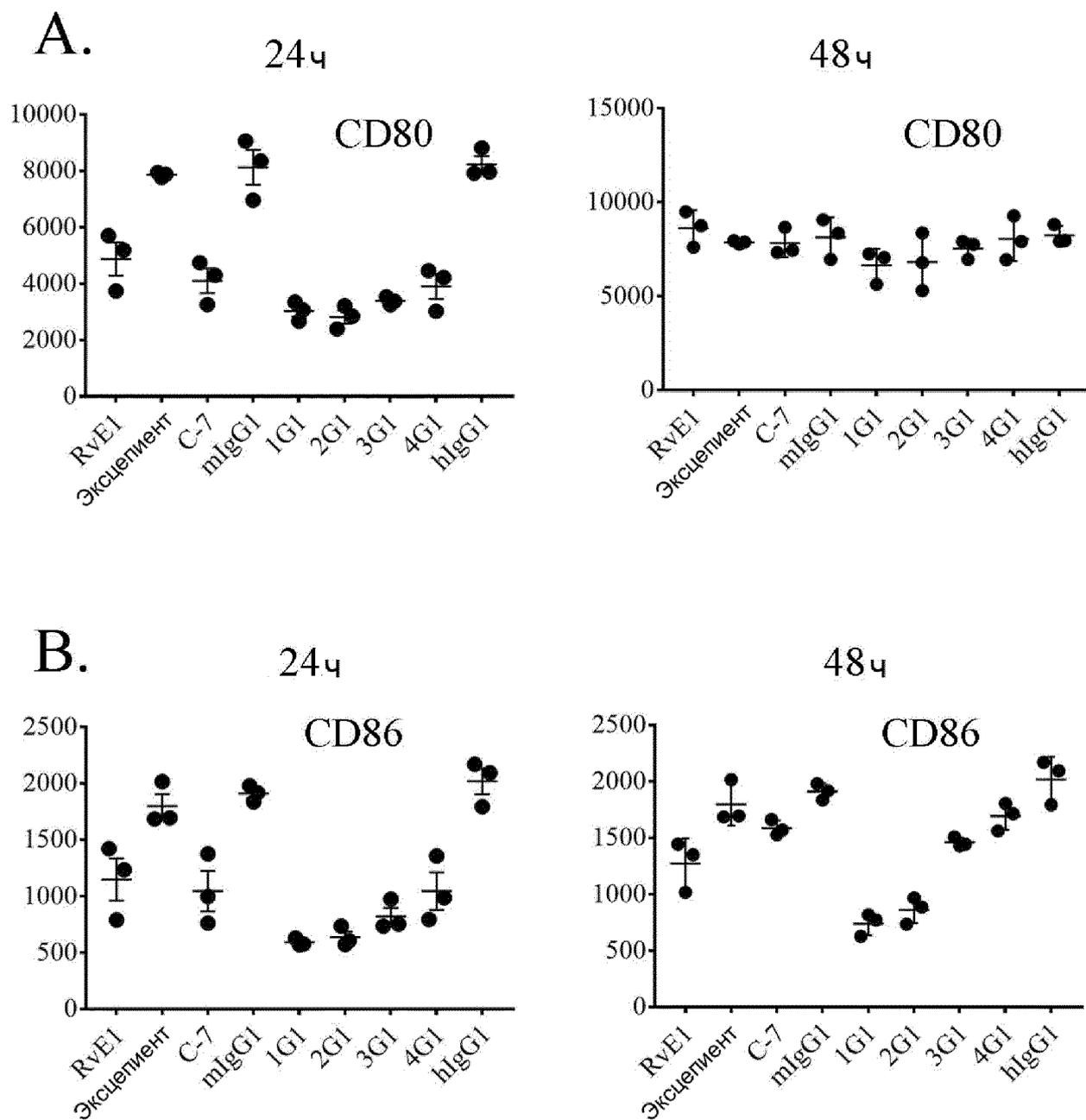
- воспалительного заболевания, в частности острых воспалительных заболеваний, хронических воспалительных заболеваний, такого как хронические воспалительные заболевания легких, кератоконъюнктивита, заболевания пародонта, экземы, воспалительного заболевания кишечника, в частности болезни Крона или колита, в

частности язвенного колита или спонтанного колита, муковисцидоза, NASH (неалкогольного стеатогепатита), склеродермии, заболевания, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), в частности при которых, в результате введения терапии, усиливается разрешение воспаления;

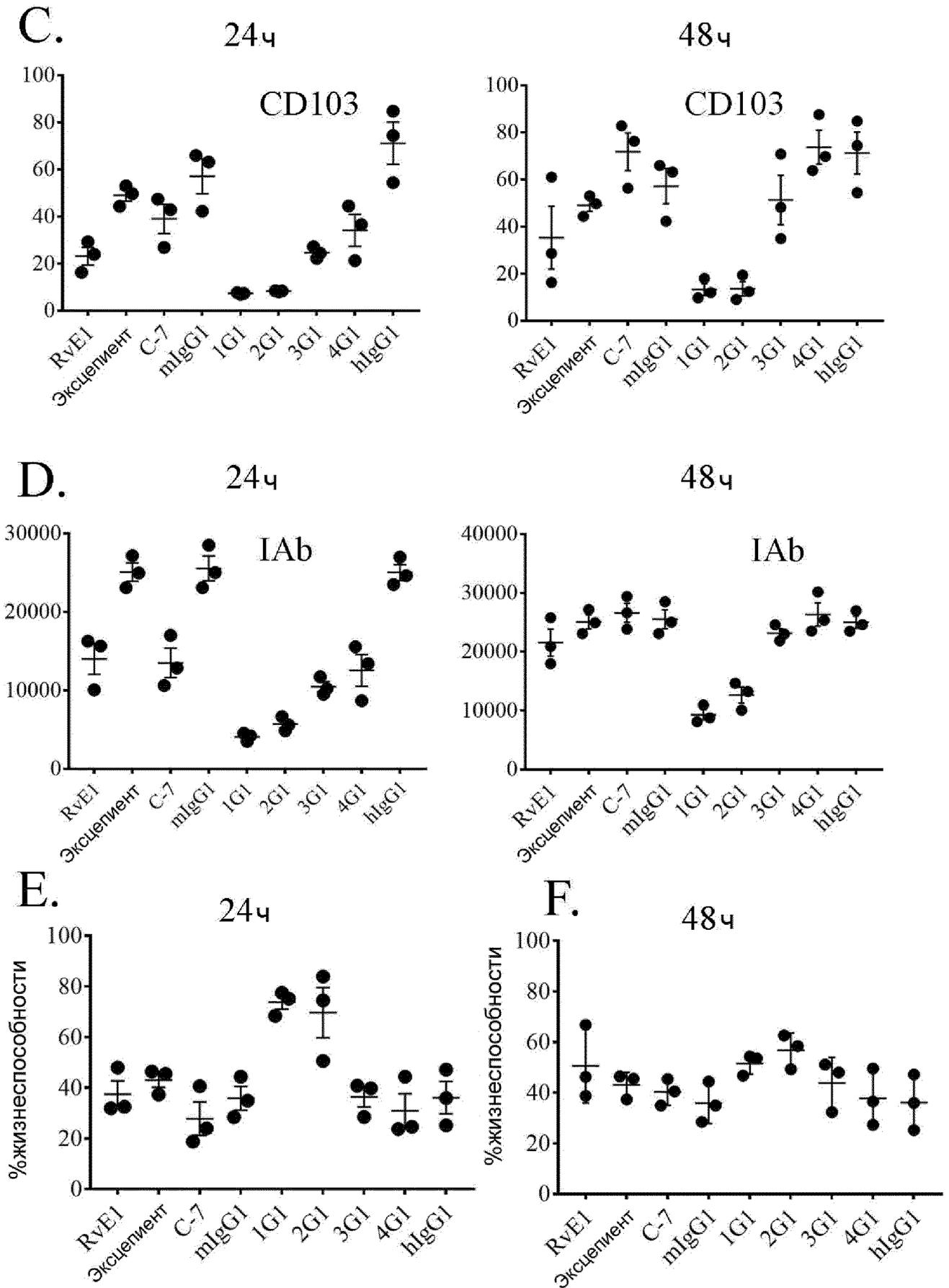
- аутоиммунного заболевания, такого как диабет, в частности диабета I типа, псориаза, волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, глютеновой болезни, васкулита, тяжелой миастении или инфекционного заболевания, такого как сепсис, перитонита, дегенеративных заболеваний, нарушения заживления ран или синдрома сухого глаза, в частности, когда в результате применения терапии ускоряется разрешение воспаления;

- ракового заболевания, в частности метастатических раковых заболеваний, солидного новообразования или гемобластоза, такого как карцинома, более конкретно гепатокарциномы, в частности карциномы молочной железы или карциномы ободочной кишки, колоректального рака или рака легкого, или мезотелиомы или миелоидного новообразования, такого как лейкоз, в частности ракового заболевания, при котором раковые клетки экспрессируют CMKLR1 или где микроокружение опухоли инвазируется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CMKLR1, в частности, при этом, в результате введения терапии, усиливается разрешение воспаления;

21. Анти-CMKLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20 для применения при профилактическом или терапевтическом лечении NASH (неалкогольного стеатогепатита), склеродермии, муковисцидоза или заболевания, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA).

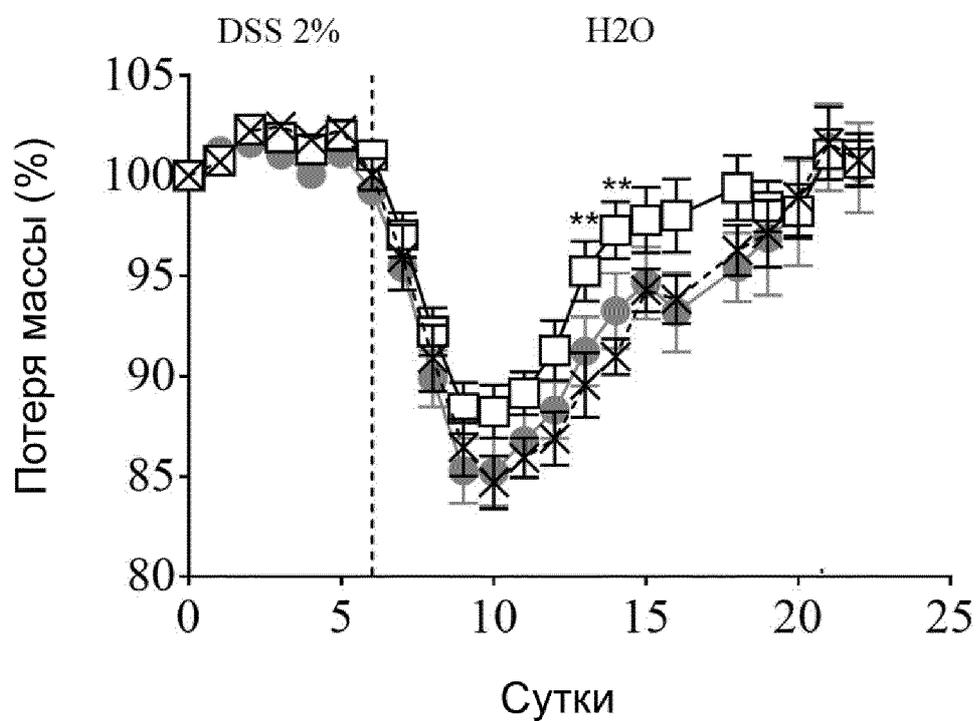


ФИГ. 1

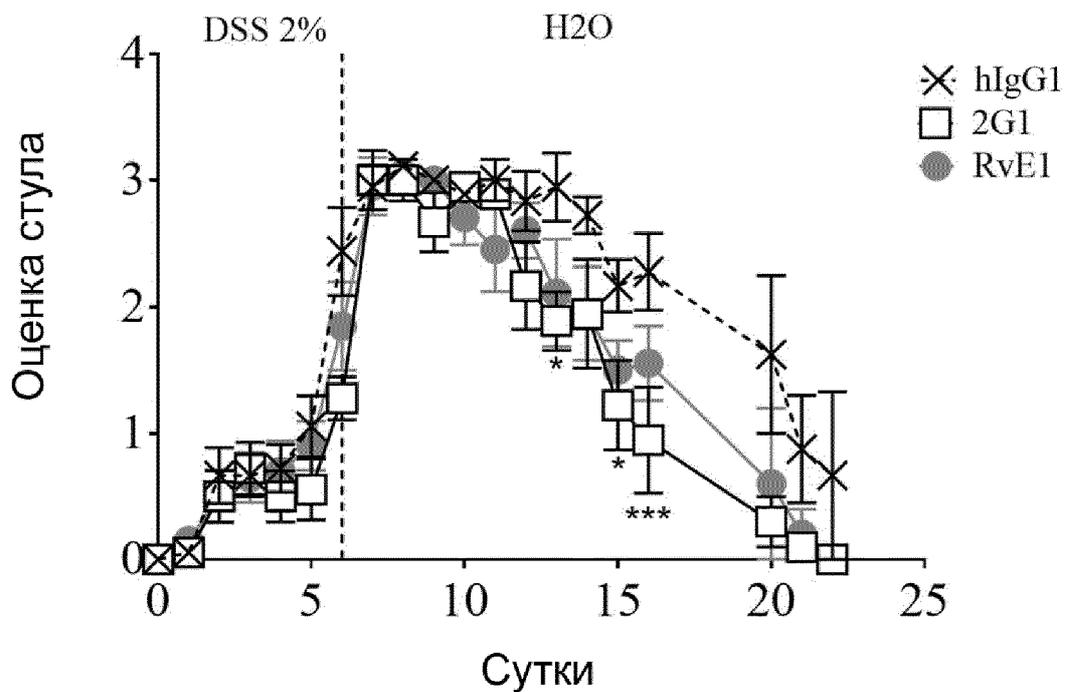


ФИГ. 1 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

А.

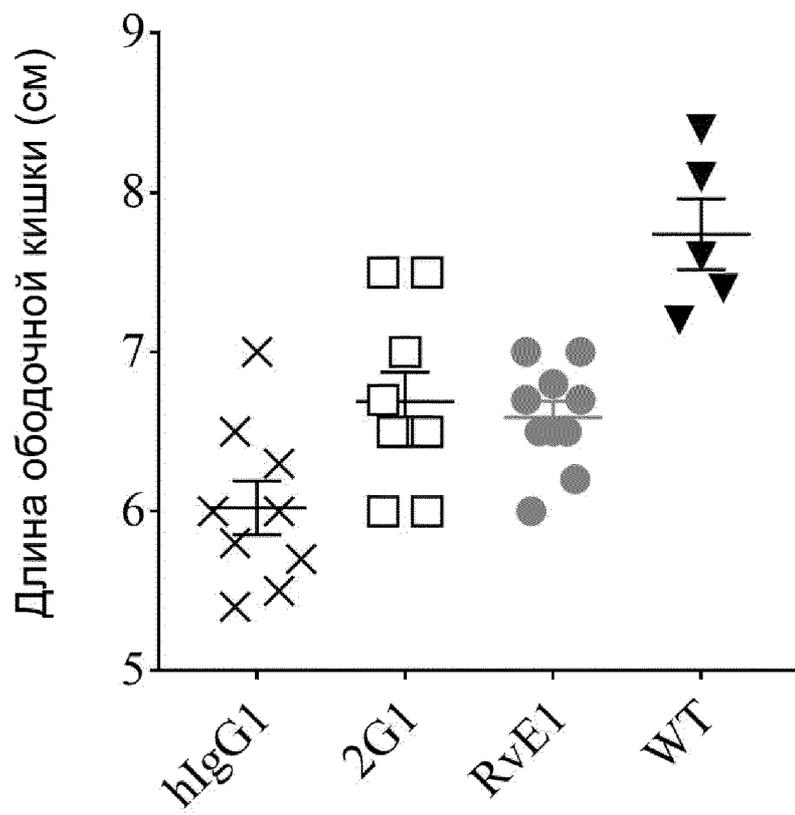


В.

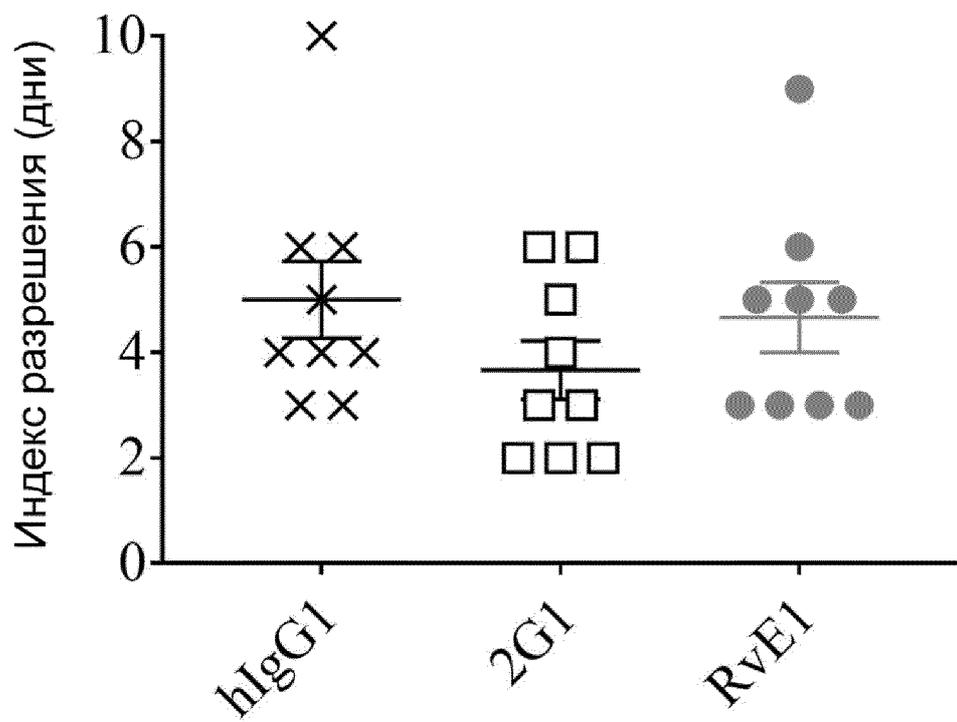


ФИГ. 2

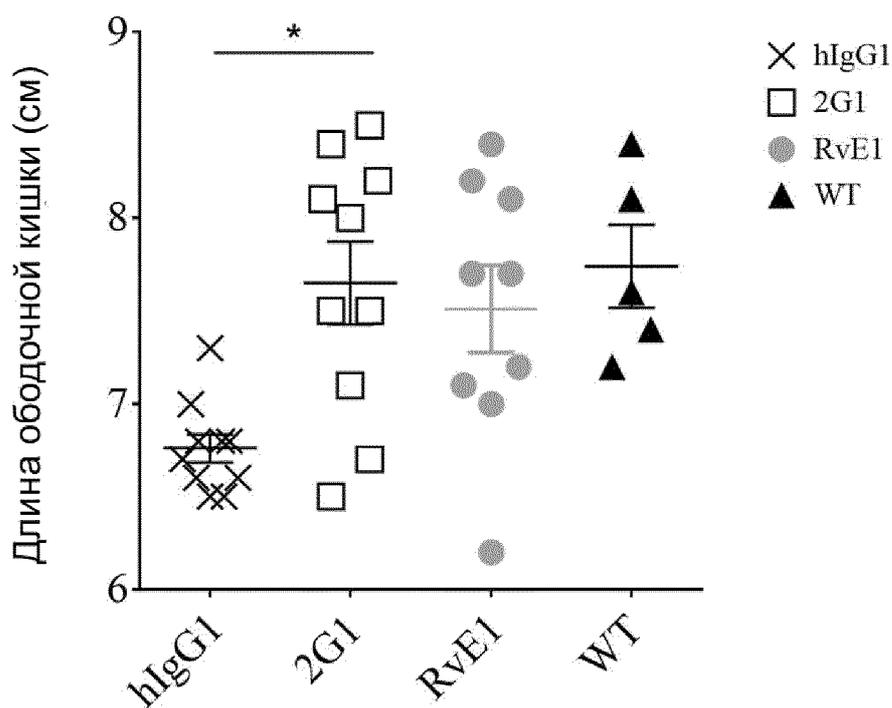
C.



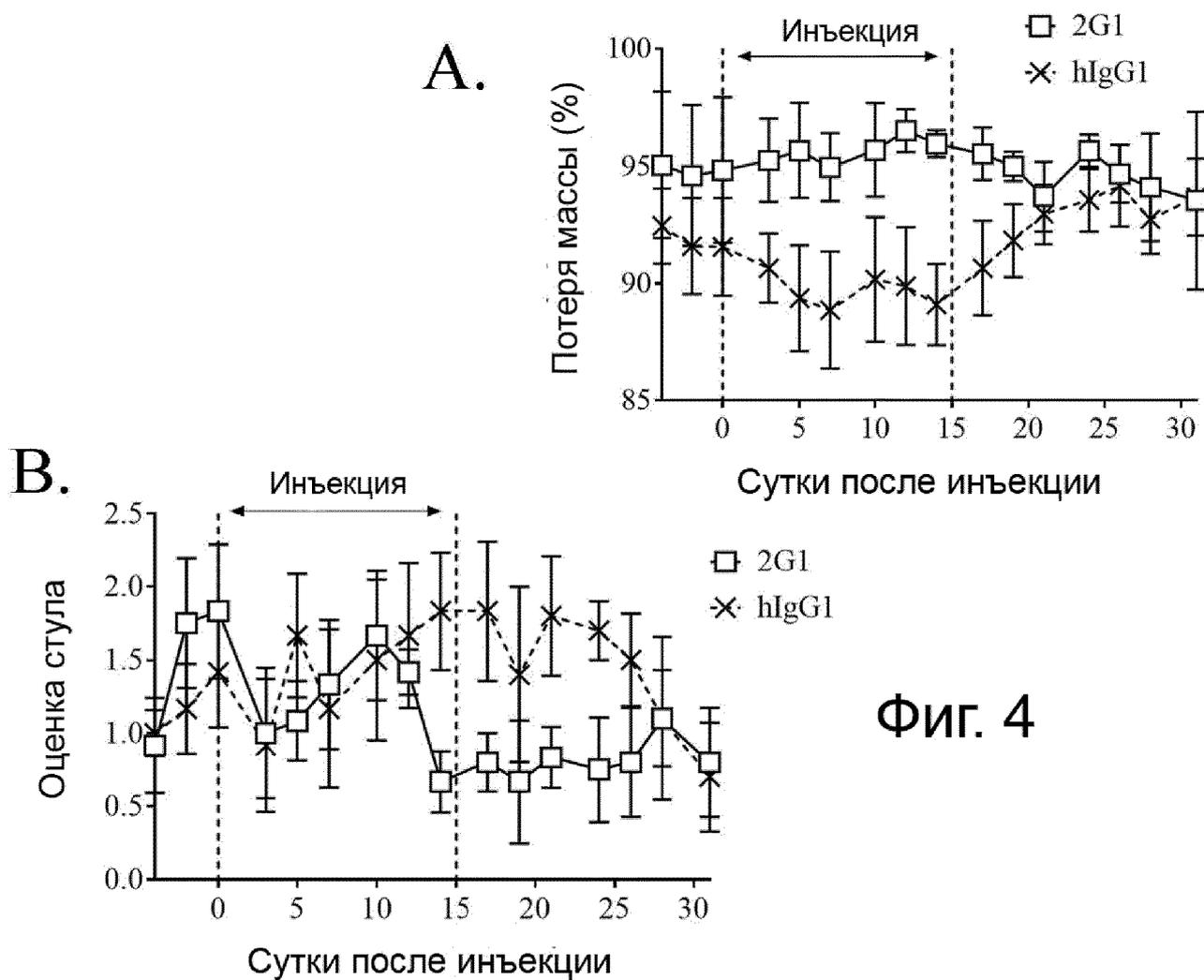
D.



ФИГ. 2 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

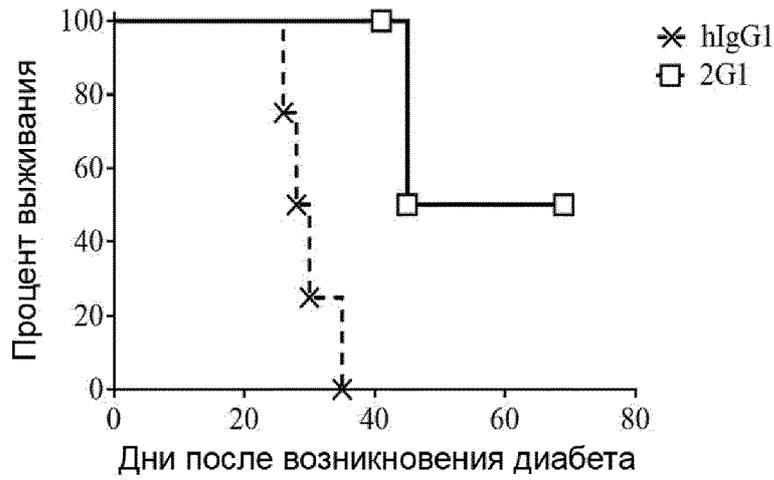


Фиг. 3

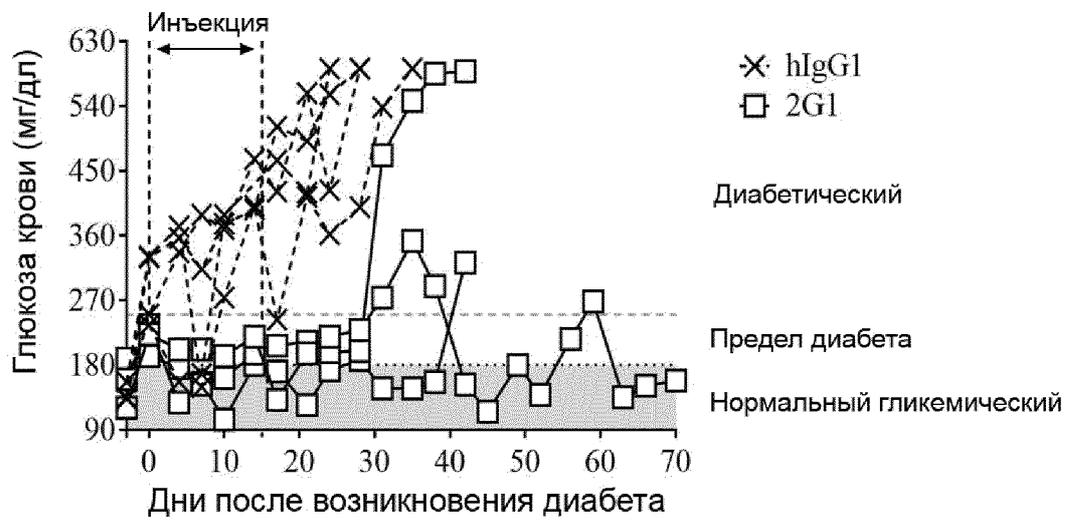


Фиг. 4

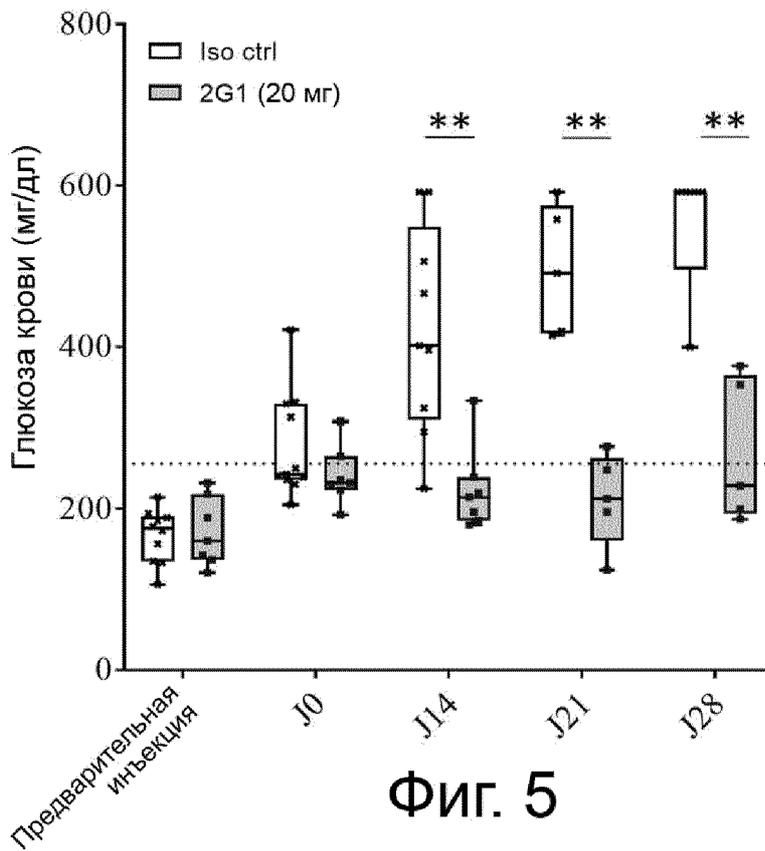
A.



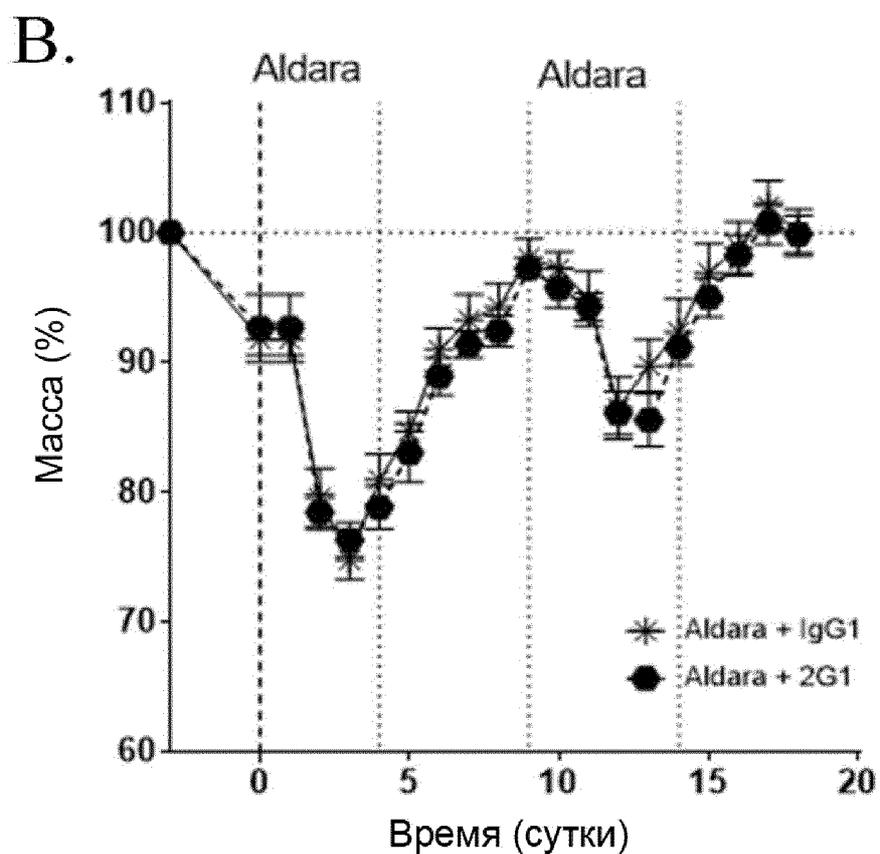
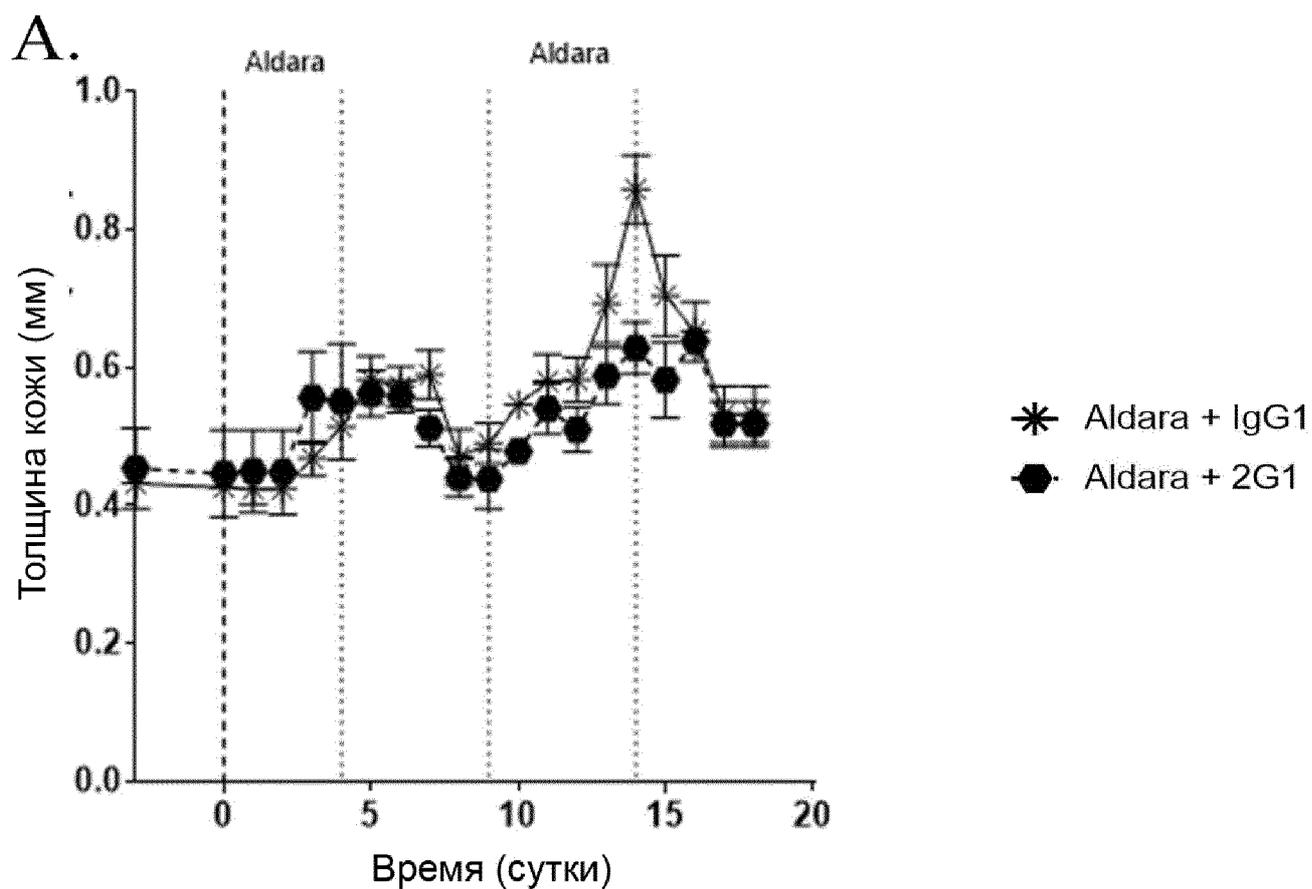
B.



C.

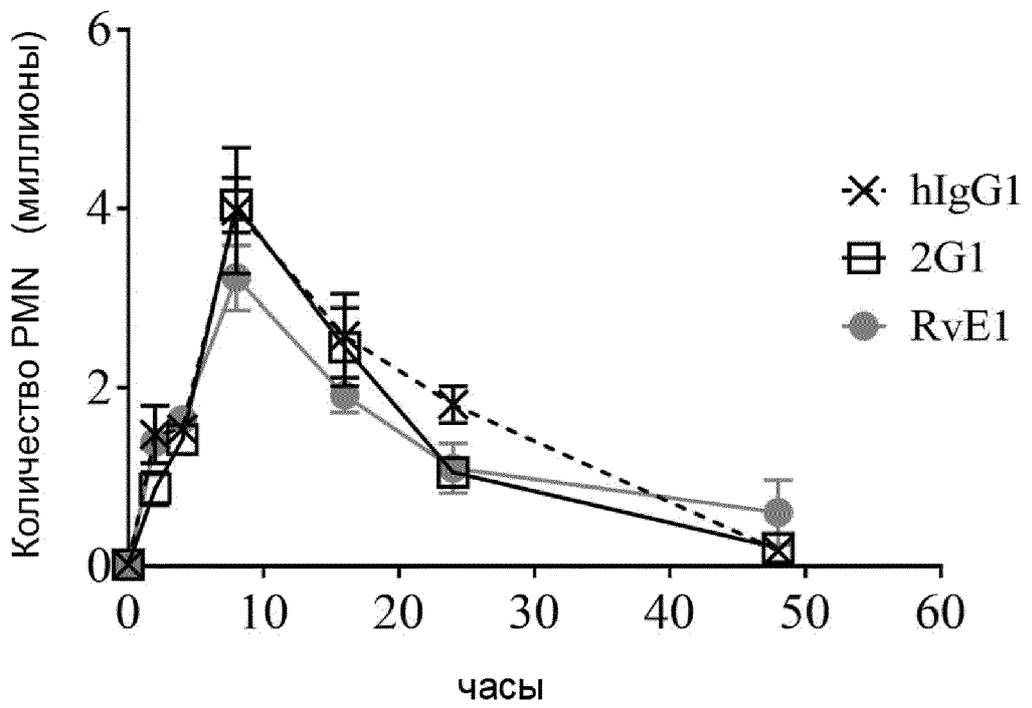


Фиг. 5

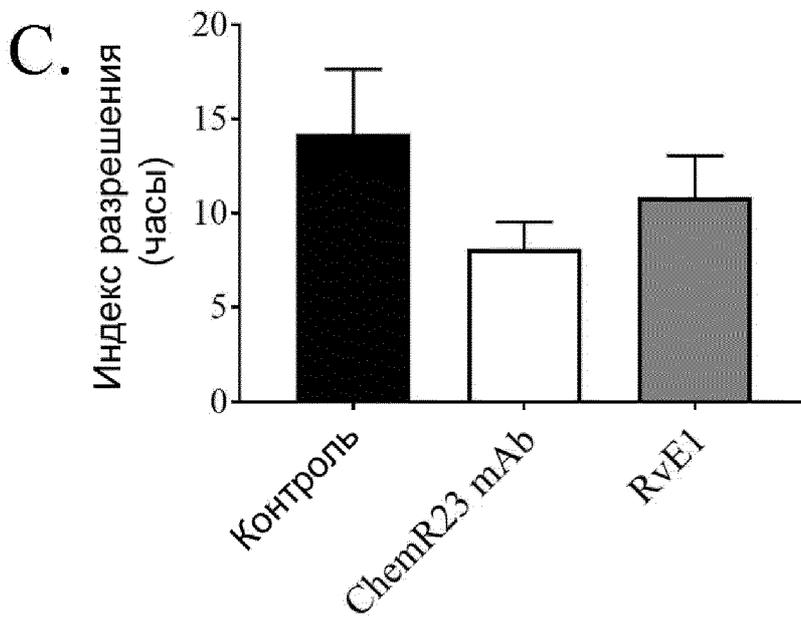
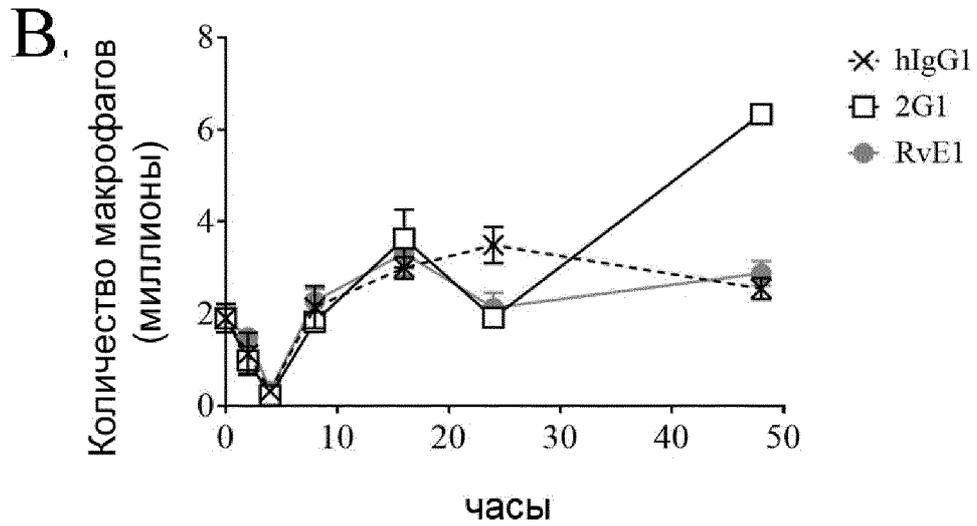


Фиг. 6

A.

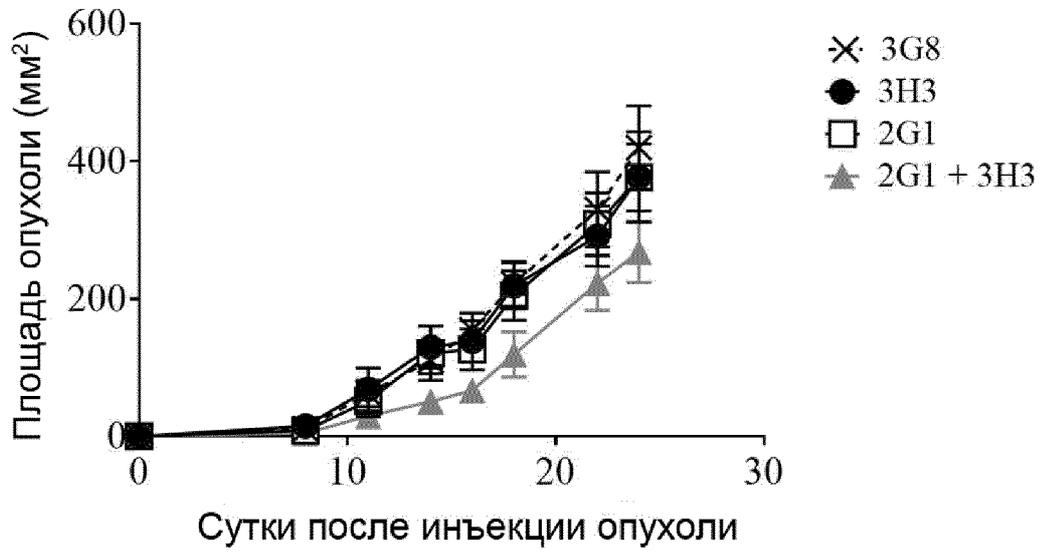


Фиг. 7

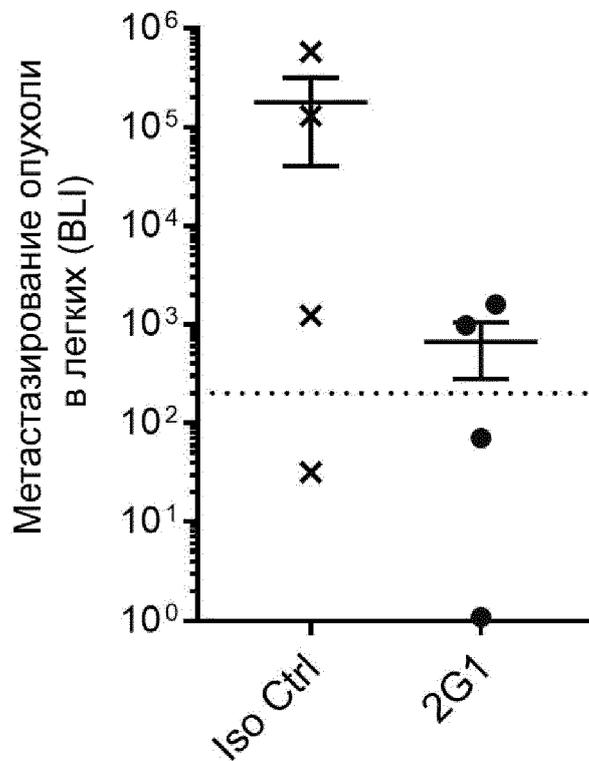


ФИГ. 7 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

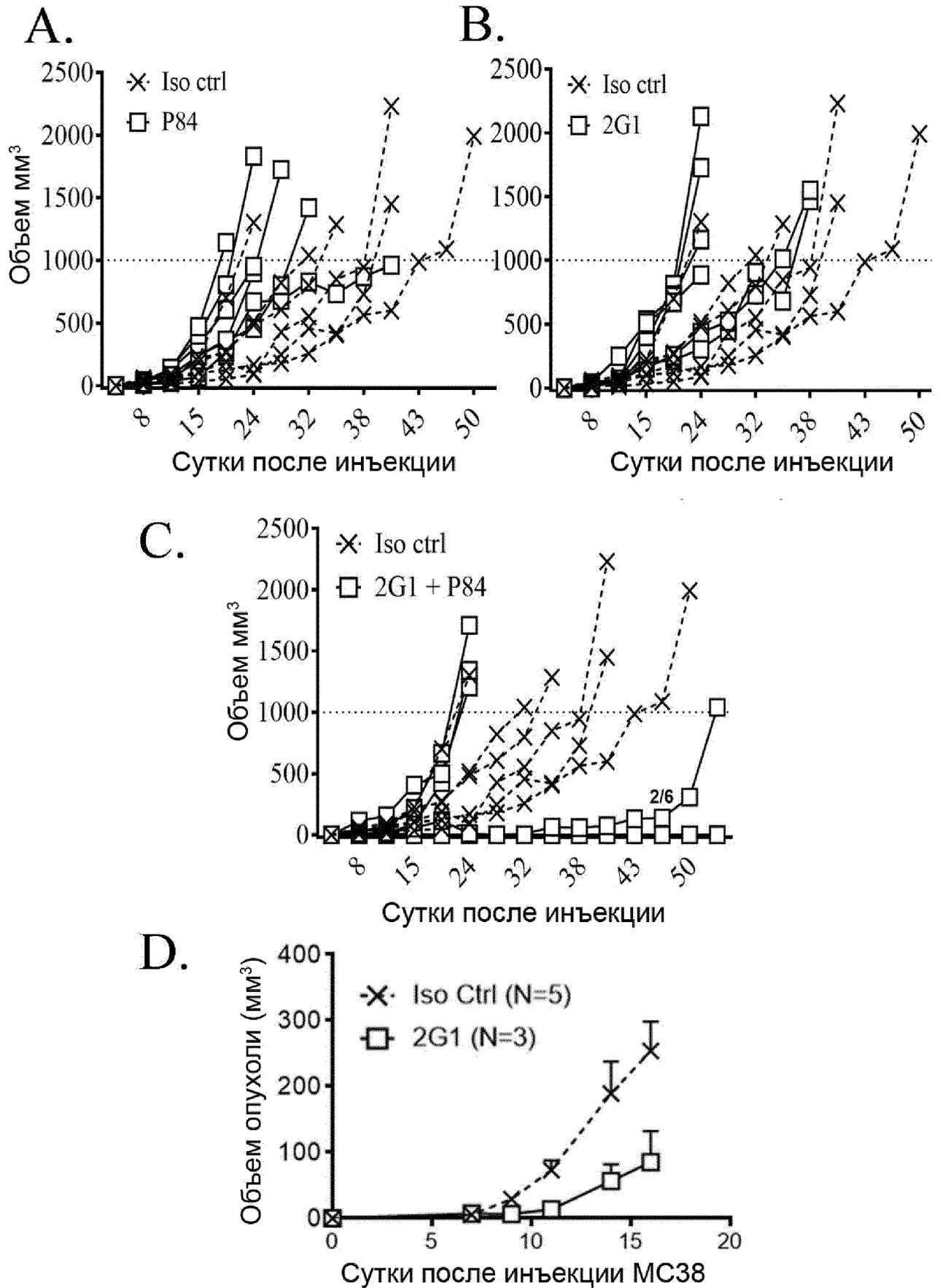
A.



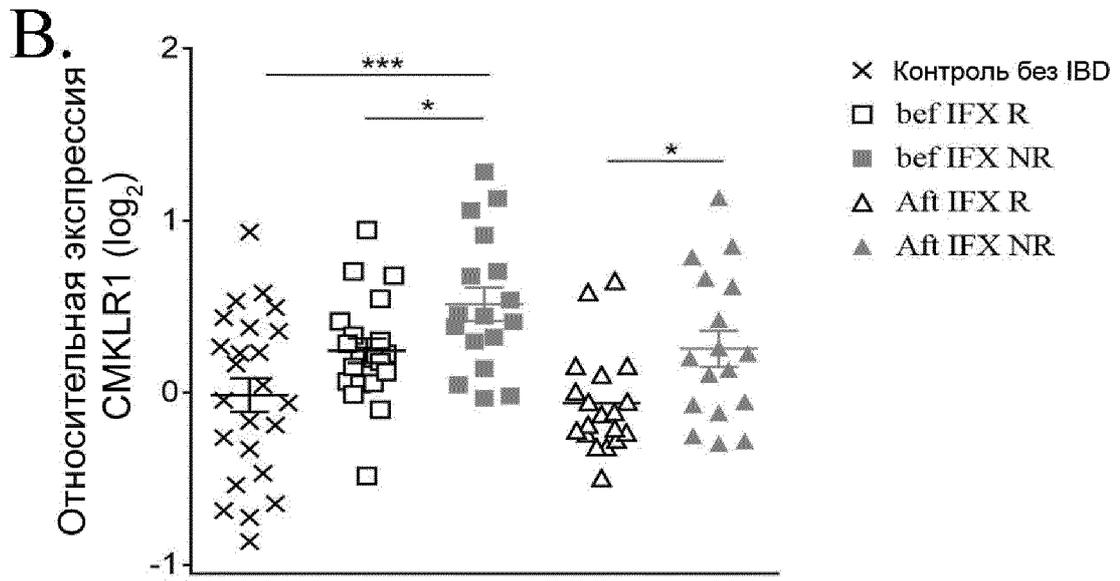
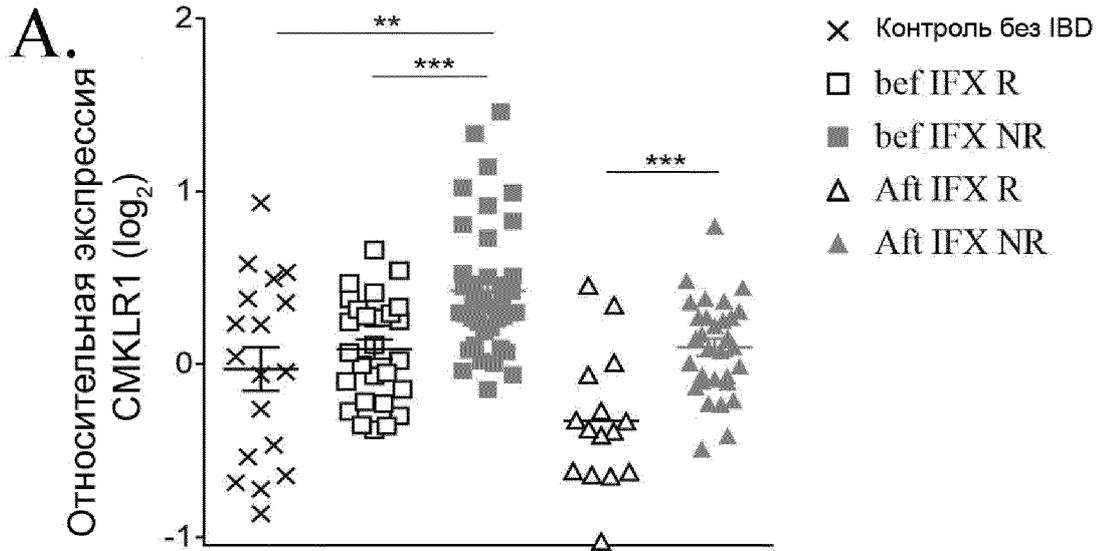
B.



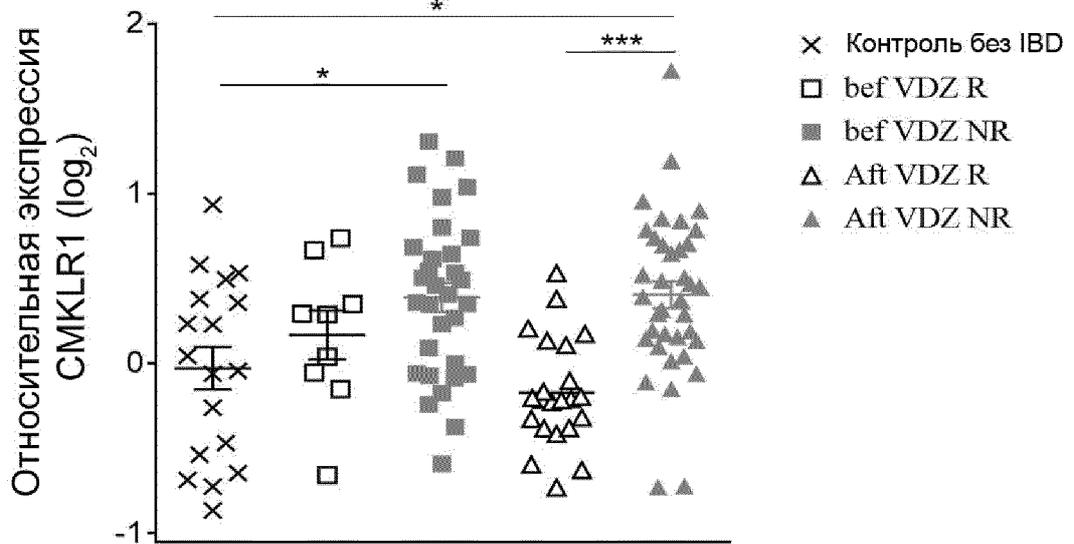
ФИГ. 8



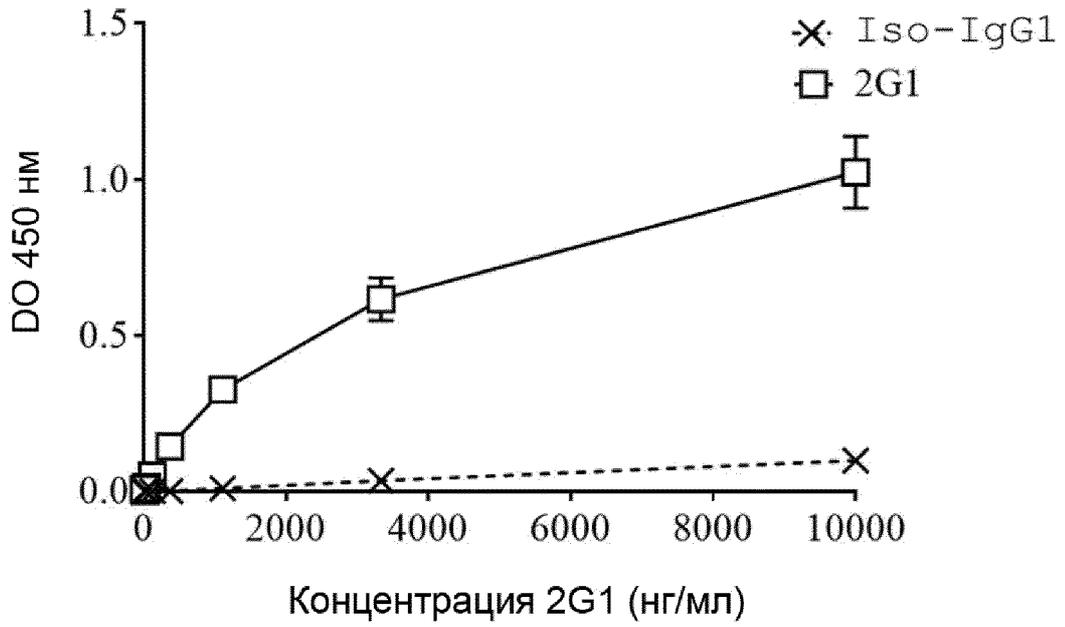
ФИГ. 9



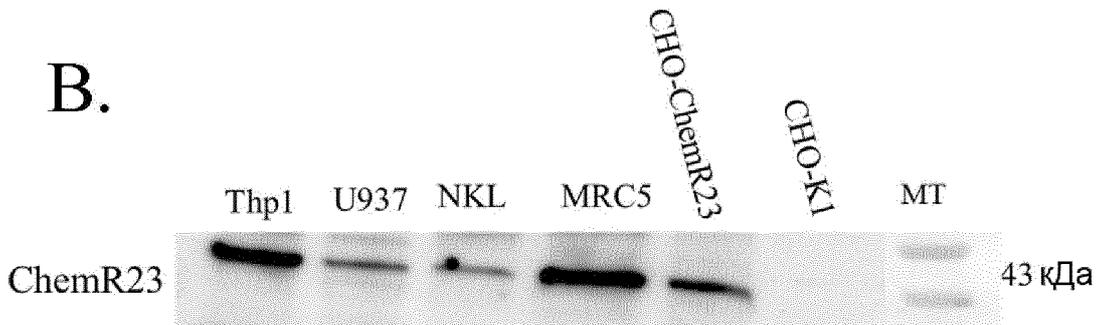
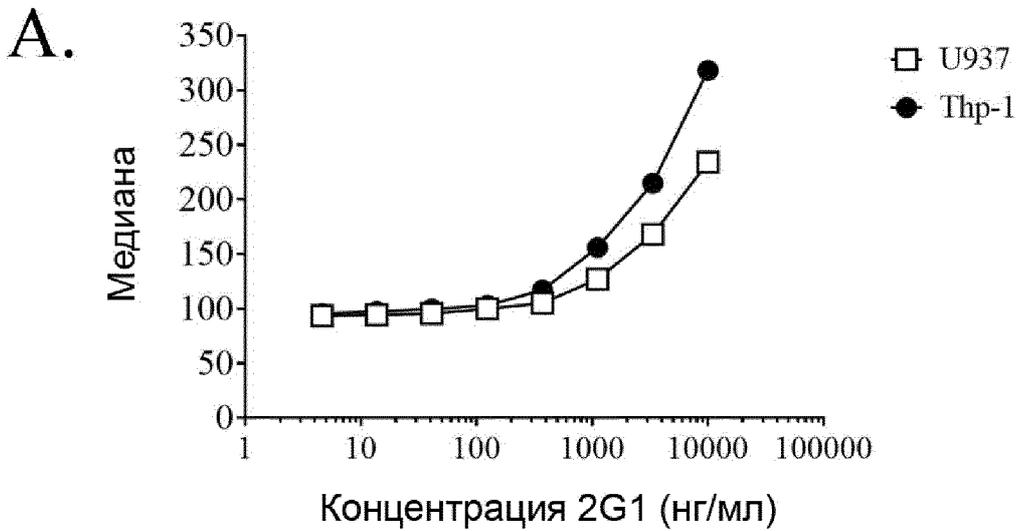
Фиг. 10



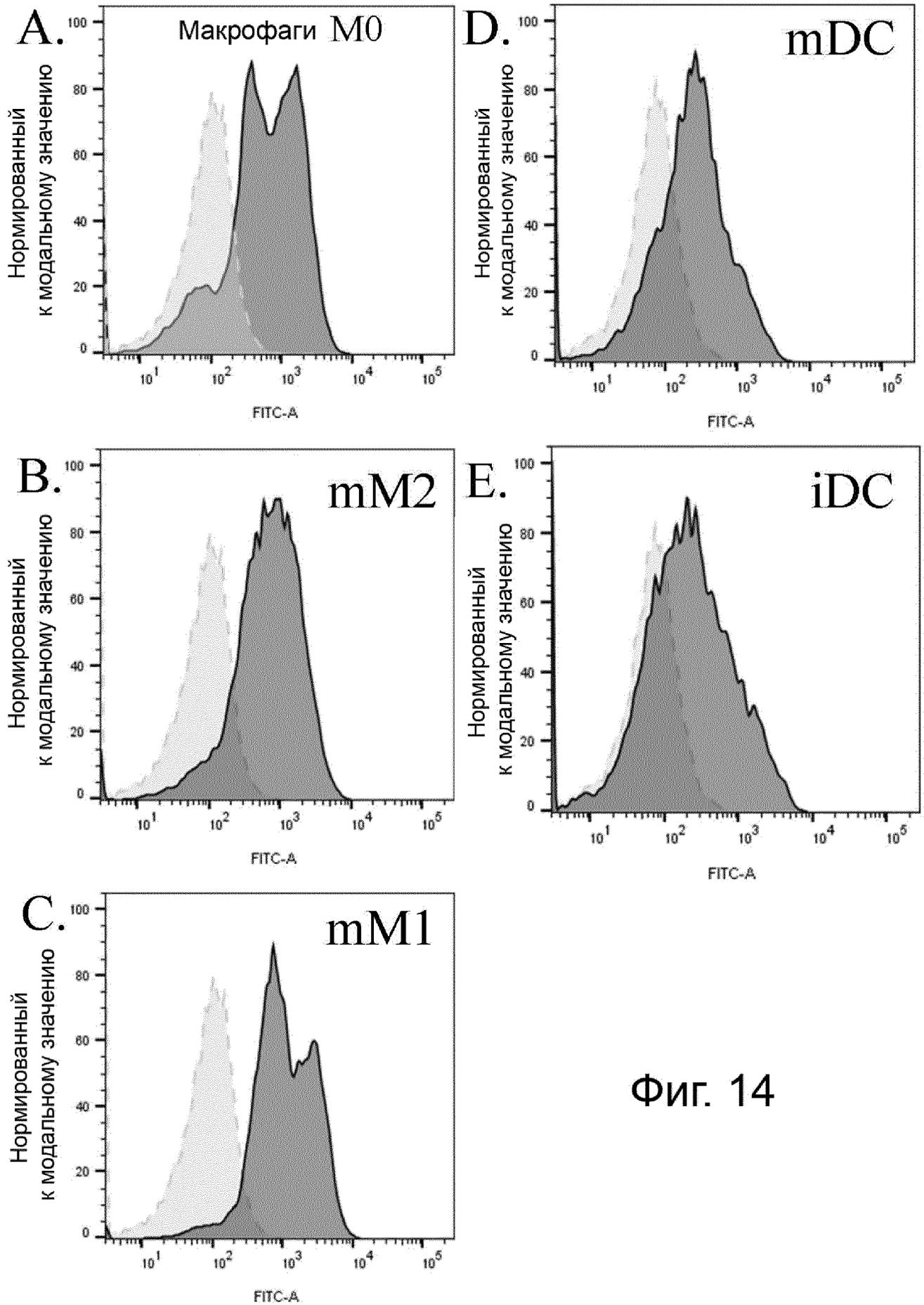
Фиг. 11

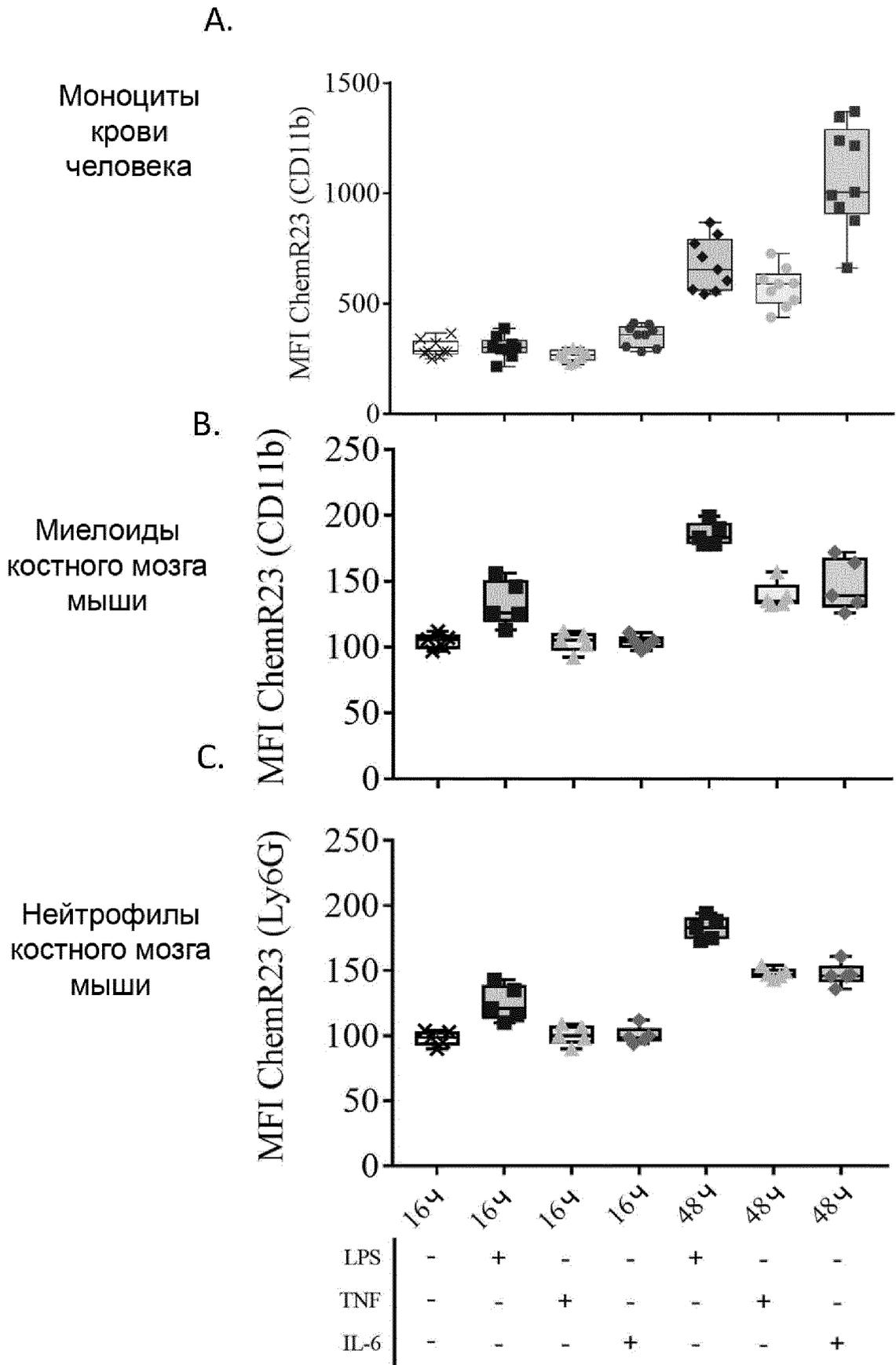


Фиг. 12

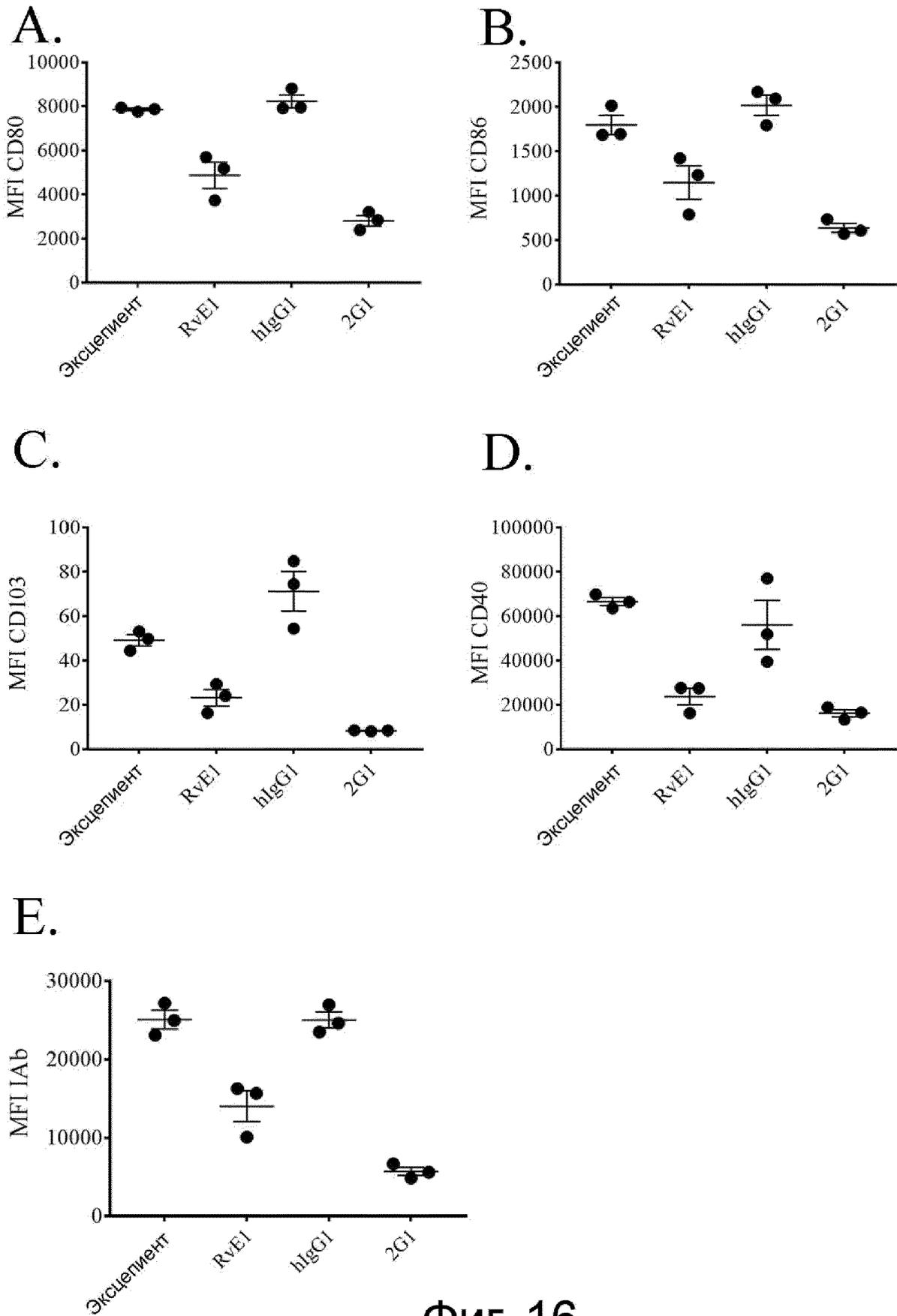


Фиг. 13

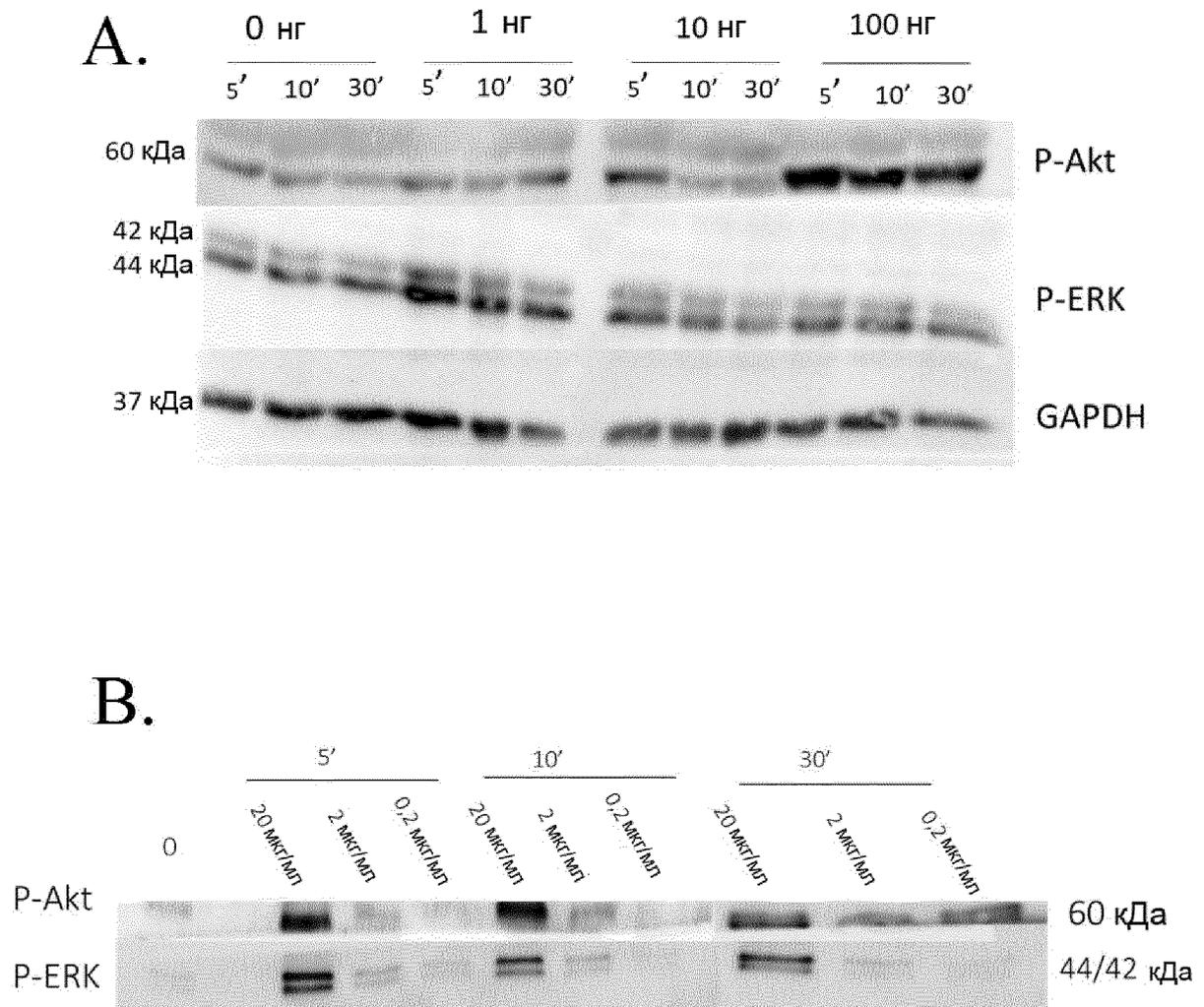




Фиг. 15

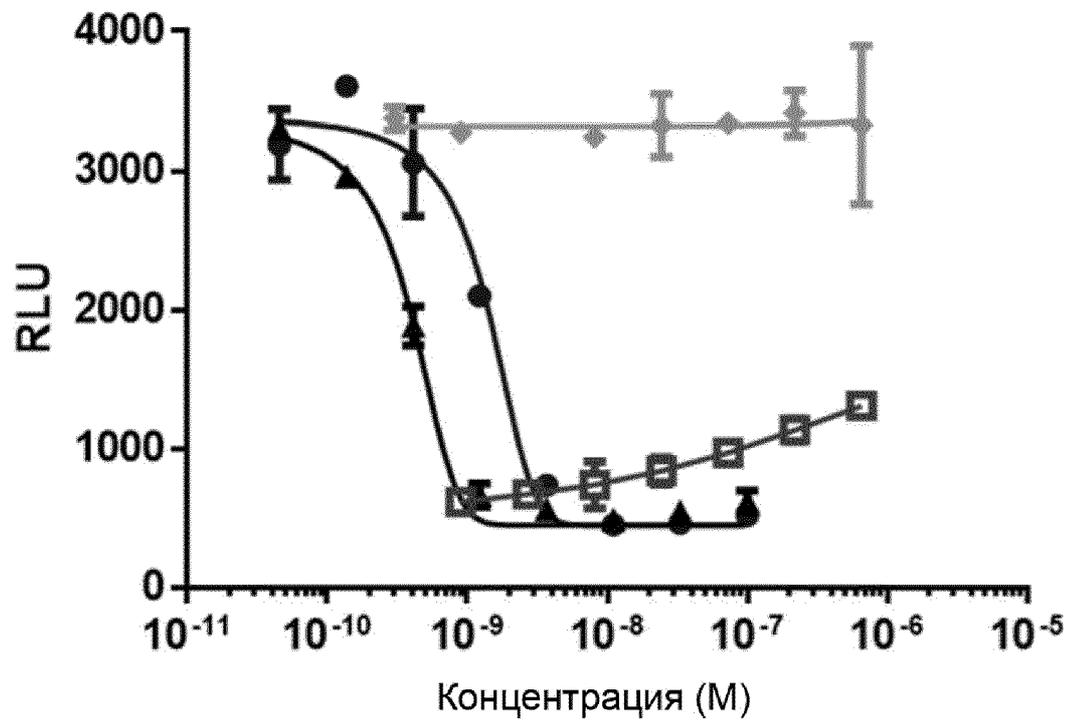


Фиг. 16

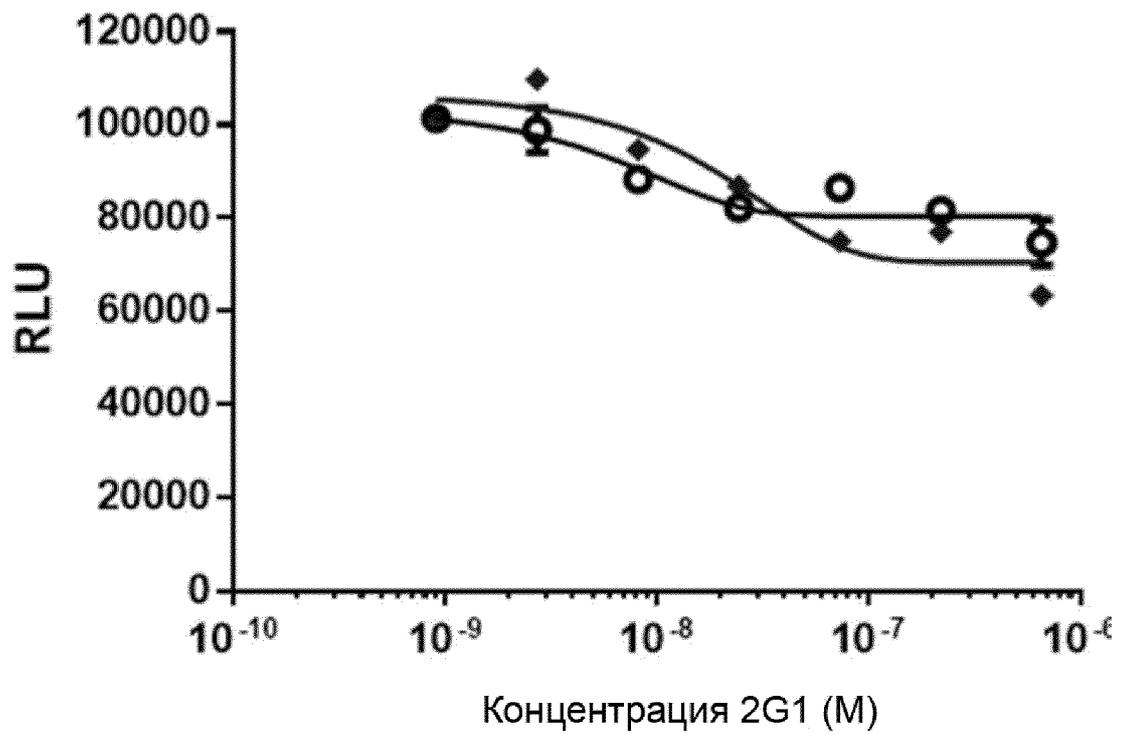


Фиг. 17

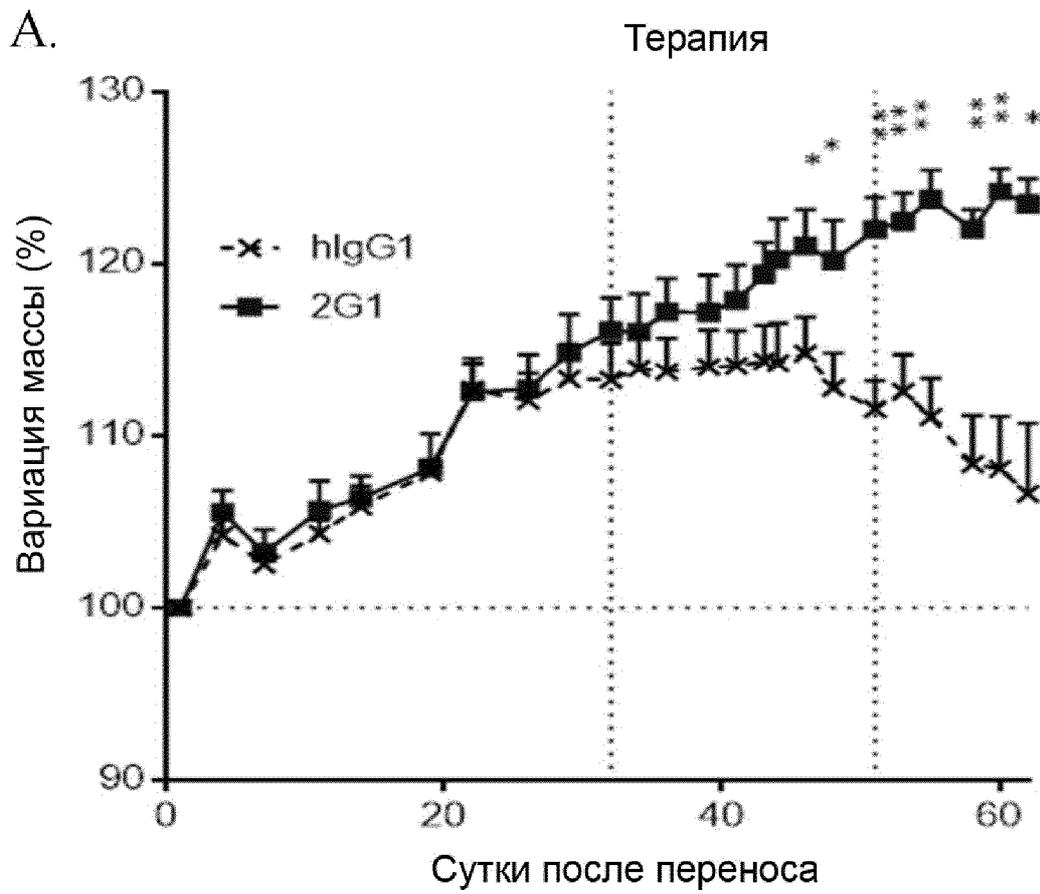
A.



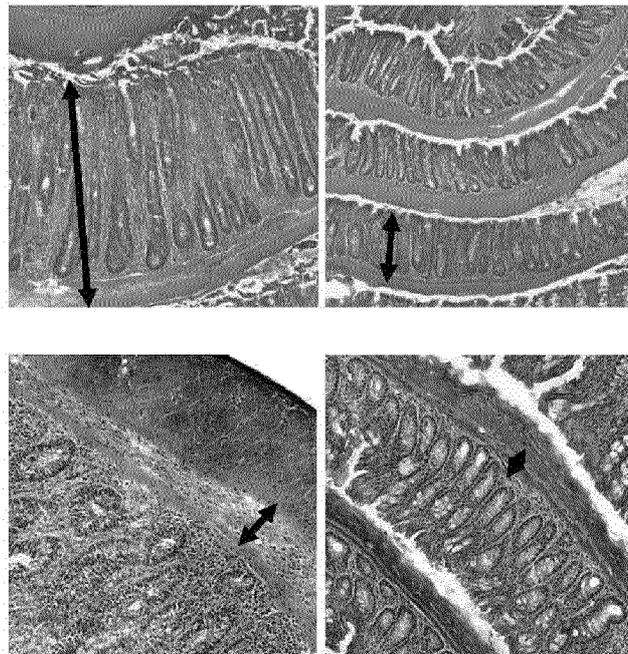
B.



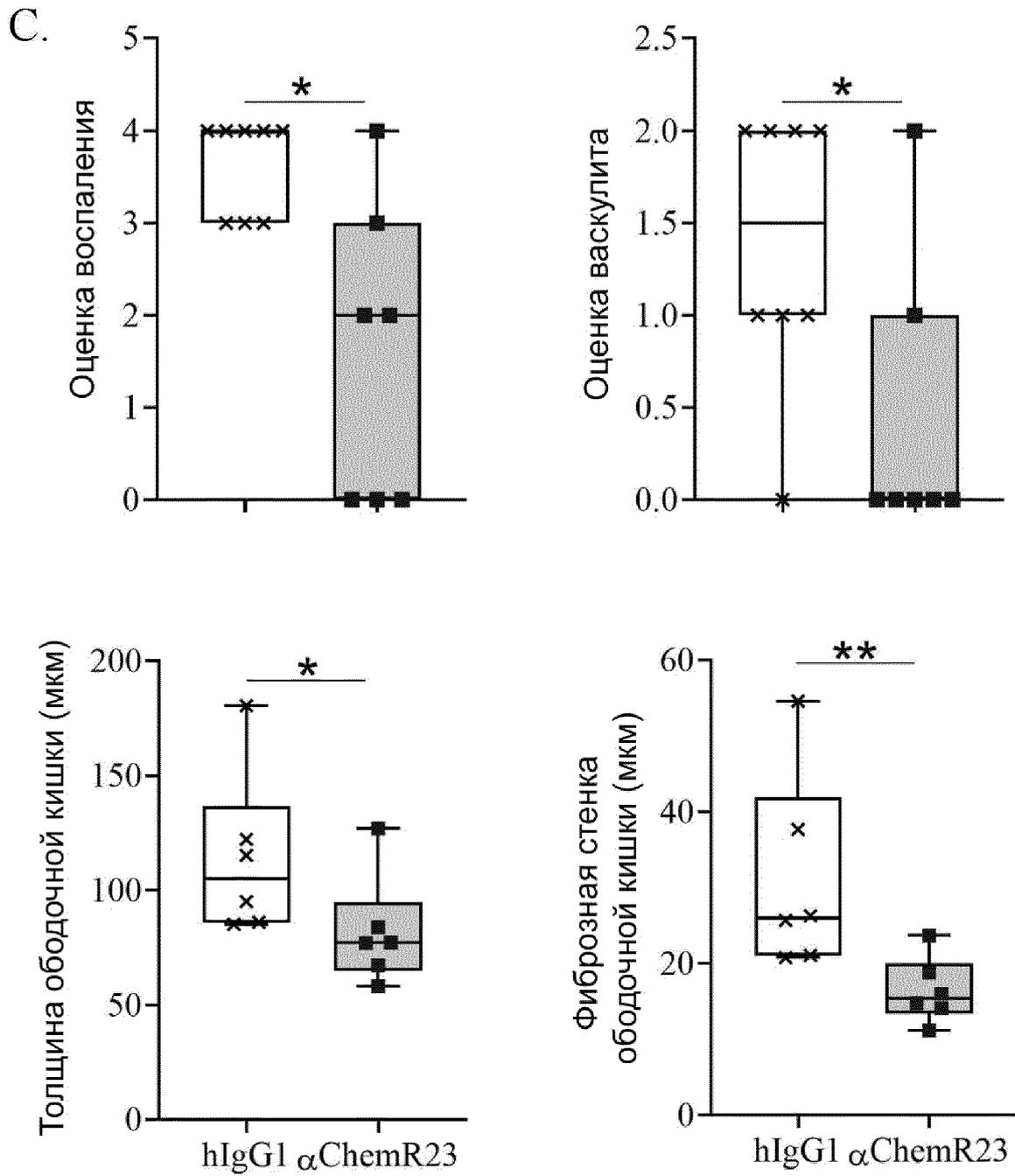
Фиг. 18



В.



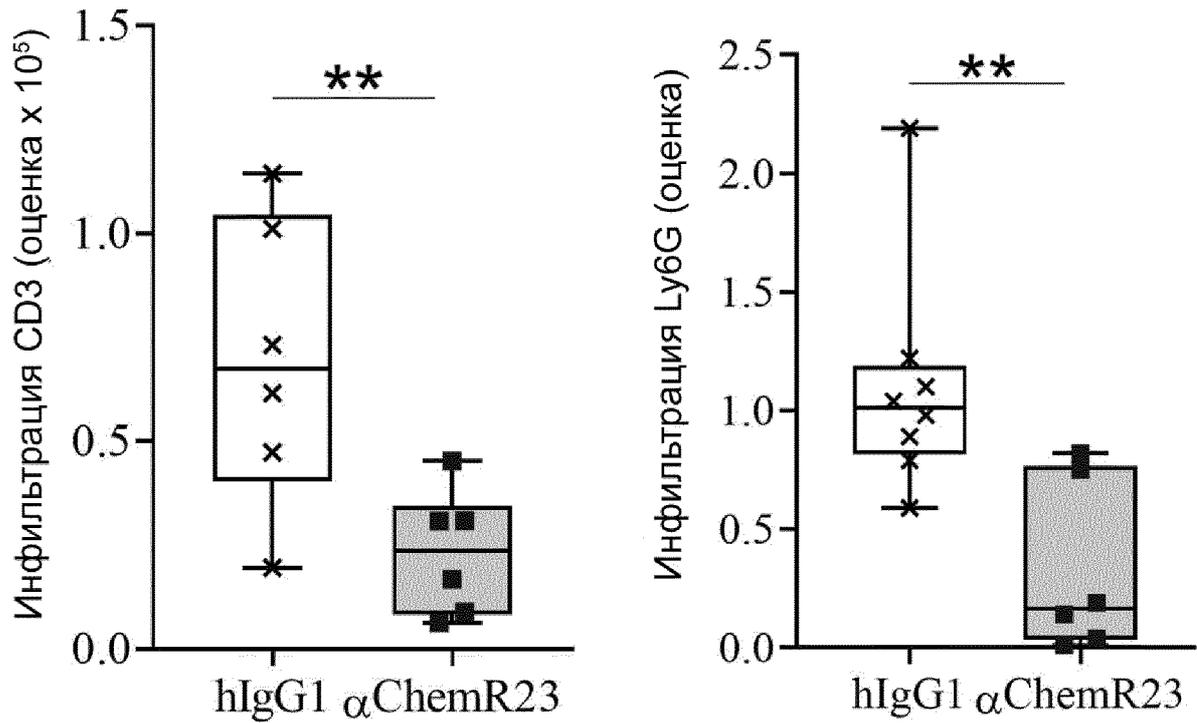
Фиг. 19



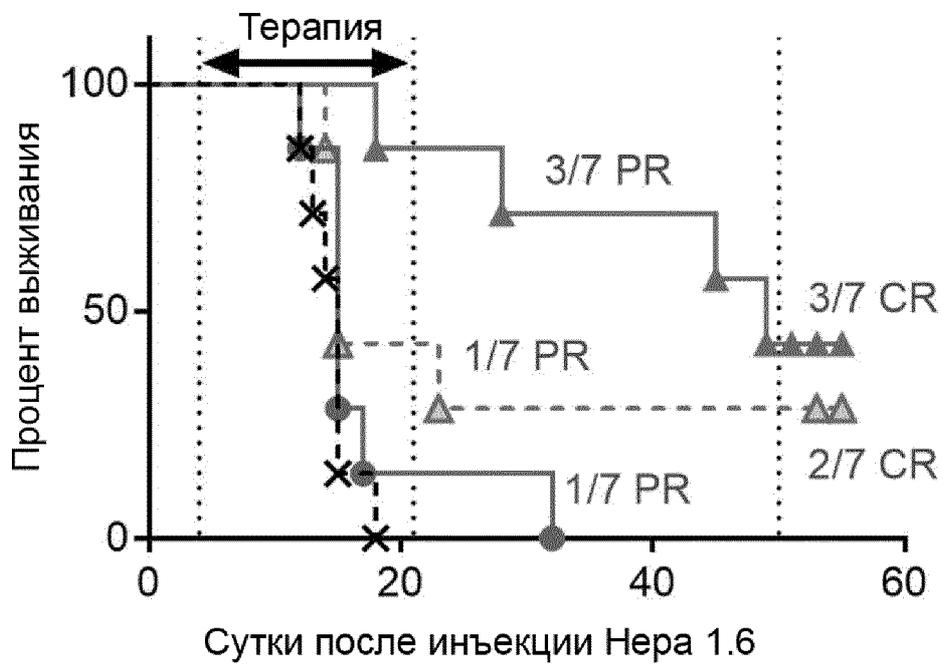
ФИГ. 19 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

D.

21/34



Фиг. 19 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 20

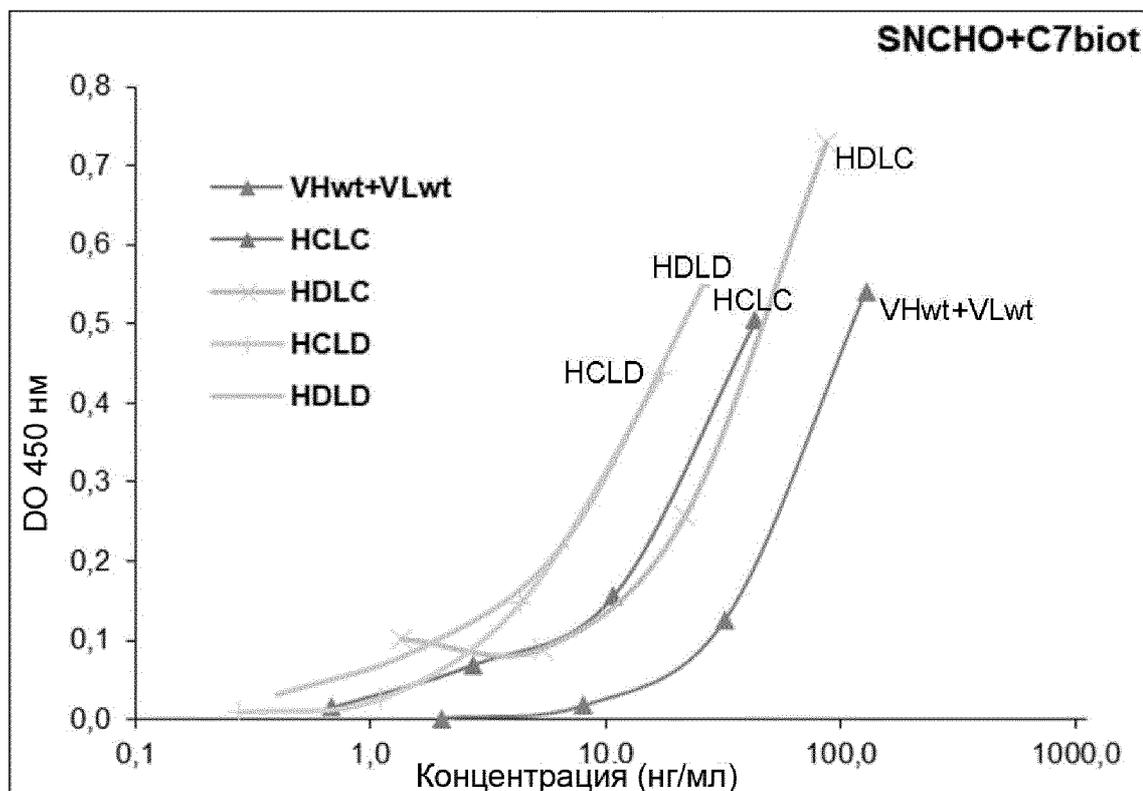
Продуцирование в COS (надосадочная жидкость)				
нг/мл	VH WT	VHvAv3-23 (SEQ 37)	VHvAV1-46	VHvAv4-1
VL WT	1028,1	501,9	<12	<12
нг/мл	VL WT	VLvAv1-13 (SEQ 49)	VLvAv6-21	VLvAv3-11
VH WT	1028,1	2035,3	158,6	75,3
VHvAv3-23 (SEQ 37)	501,9	861,1	-	-

Продуцирование в CHO (надосадочная жидкость)				
нг/мл	VH WT	VHvAv3-23 (SEQ 37)	VHvAV1-46	VHvAv4-1
VL WT	509,3	249,7	<12	<12
нг/мл	VL WT	VLvAv1-13 (SEQ 49)	VLvAv6-21	VLvAv3-11
VH WT	509,3	831,3	78,4	40,4
VHvAv3-23 (SEQ 37)	249,7	443,7	-	-

Фиг. 21

Продуцирование клетки CHO и очистка на протеине А		
	Концентрация (мг/мл)	Выход (мг/л)
VH WT + VL WT	2,8	33,6
VH WT + VLvAv1-13 (SEQ 49)	0,96	4
VHvAv3-23 (SEQ 37) + VLvAv1-13 (SEQ 49)	2,3	21,08

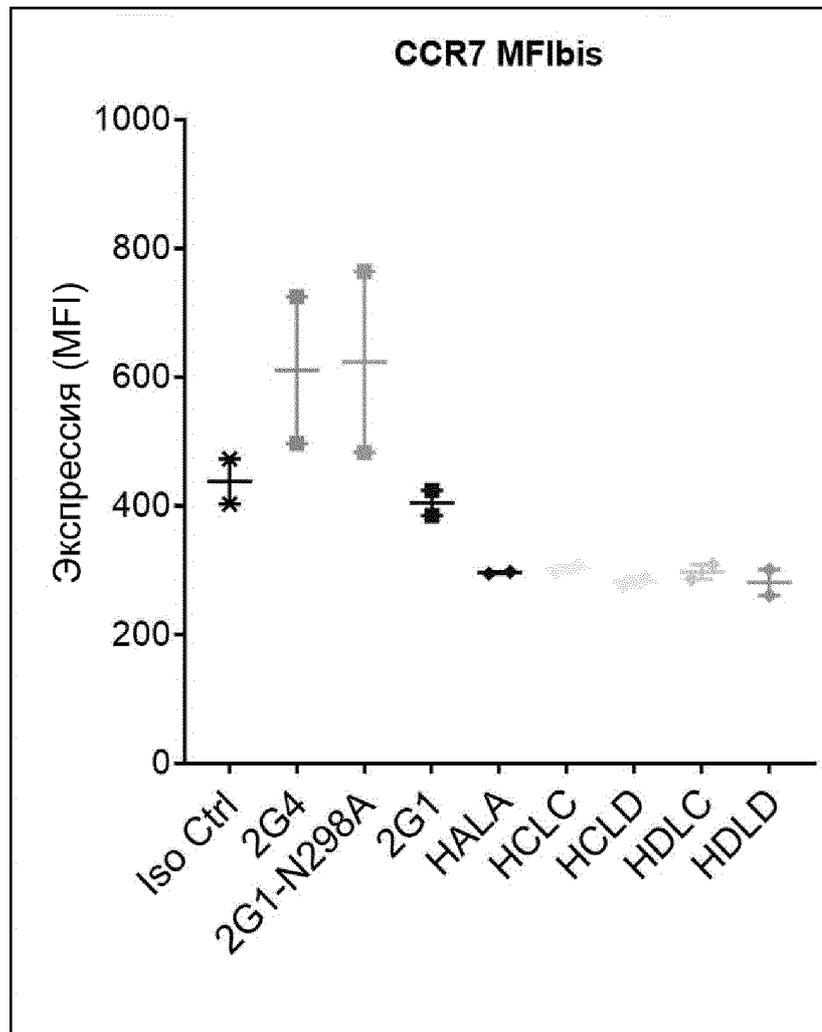
Фиг. 22



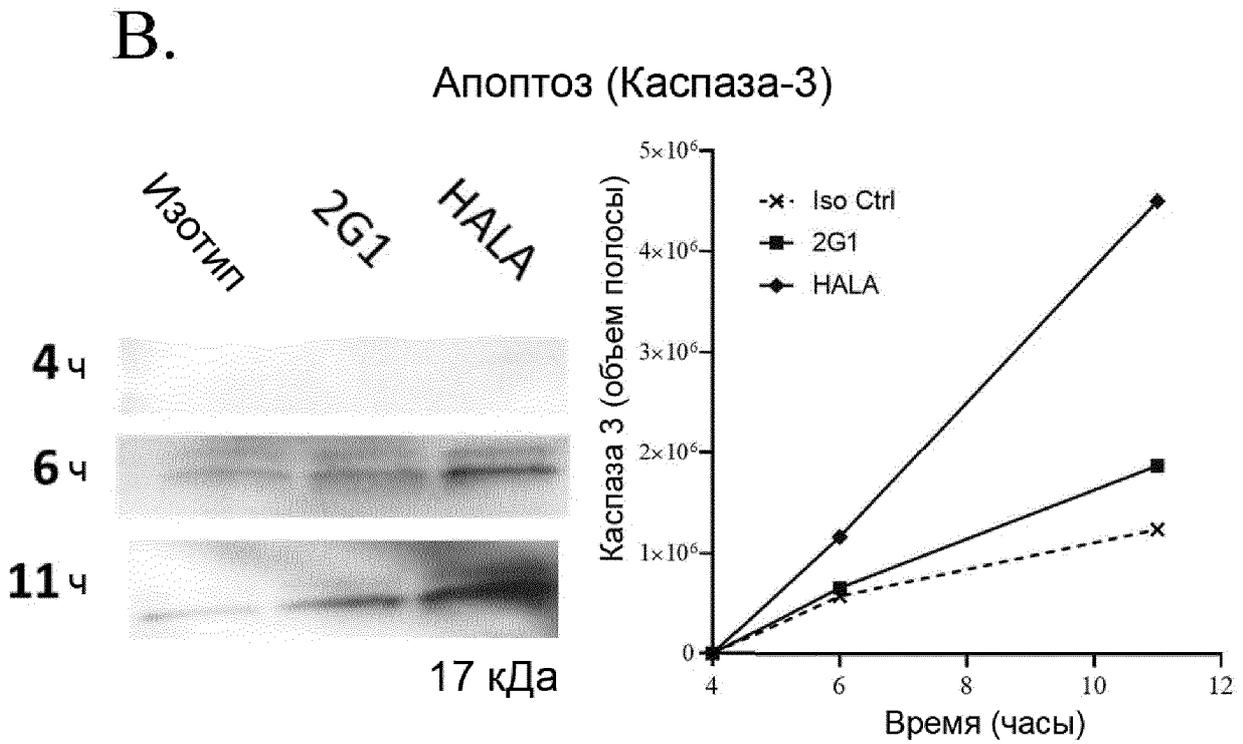
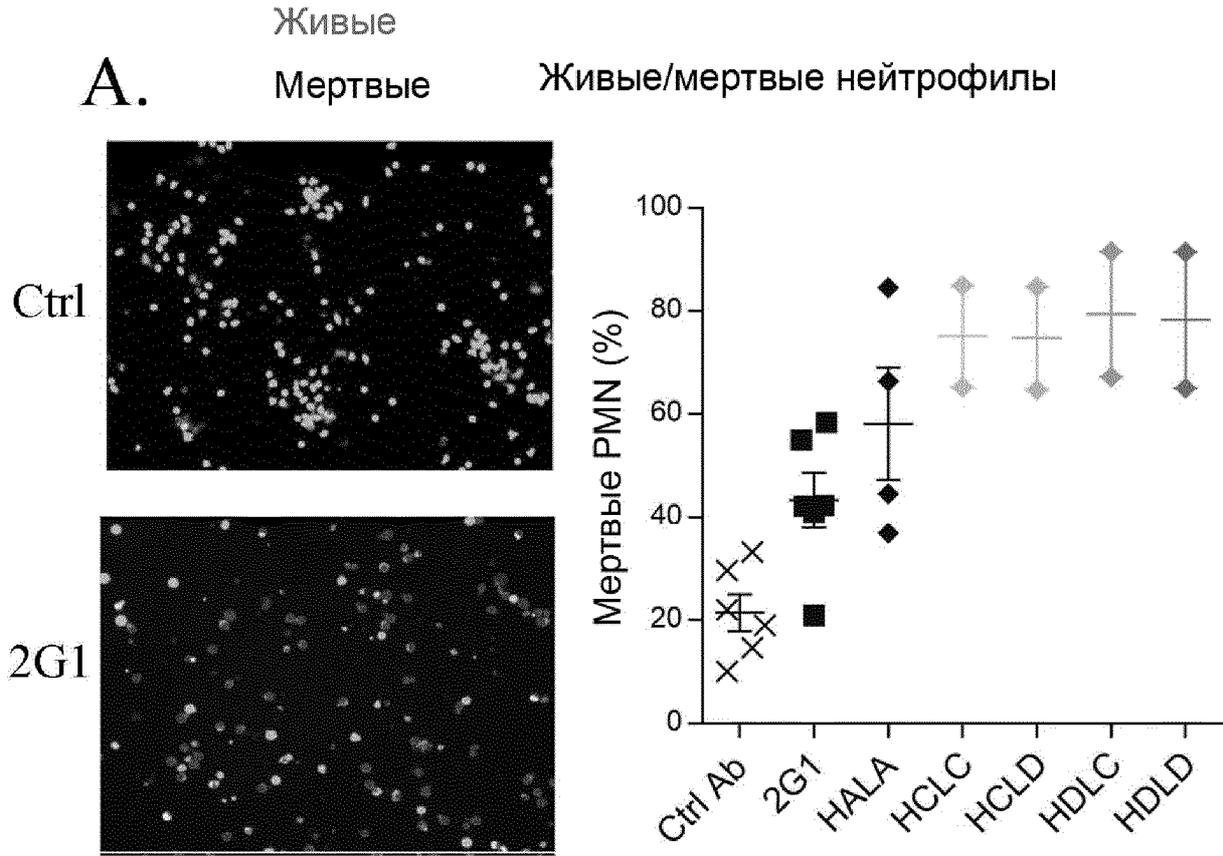
Фиг. 23

	ED50 (нг/мл)
2G1wt	269,2
HALA	557,3
HCLC	167,4
HCLD	332,9
HDLC	196,6
HDLD	195,1

Фиг. 24



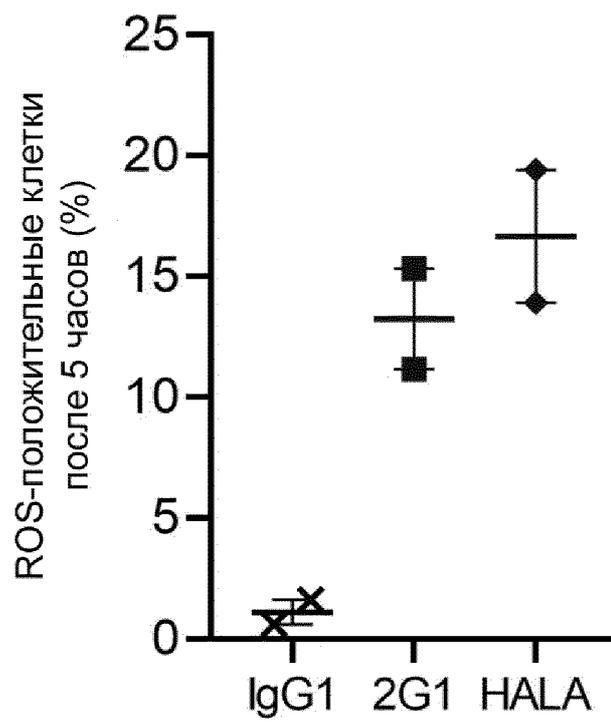
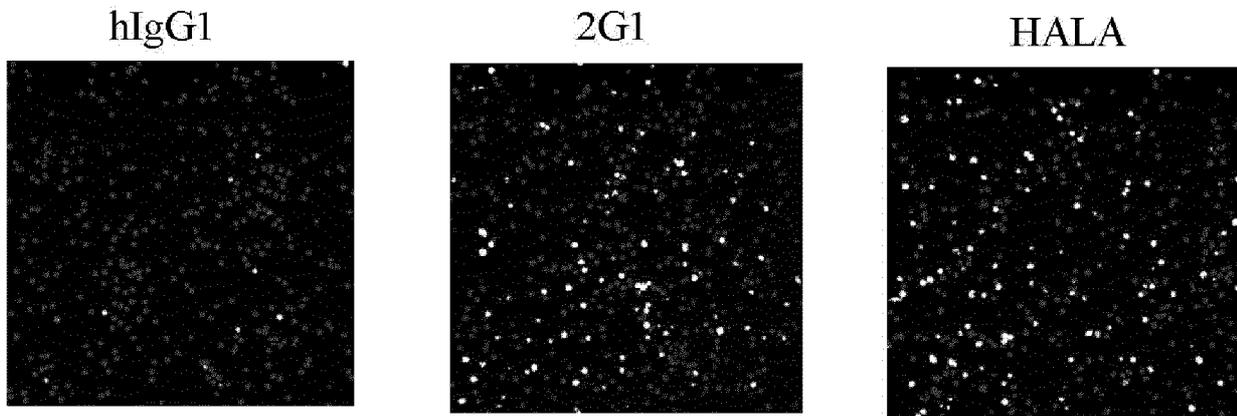
Фиг. 25



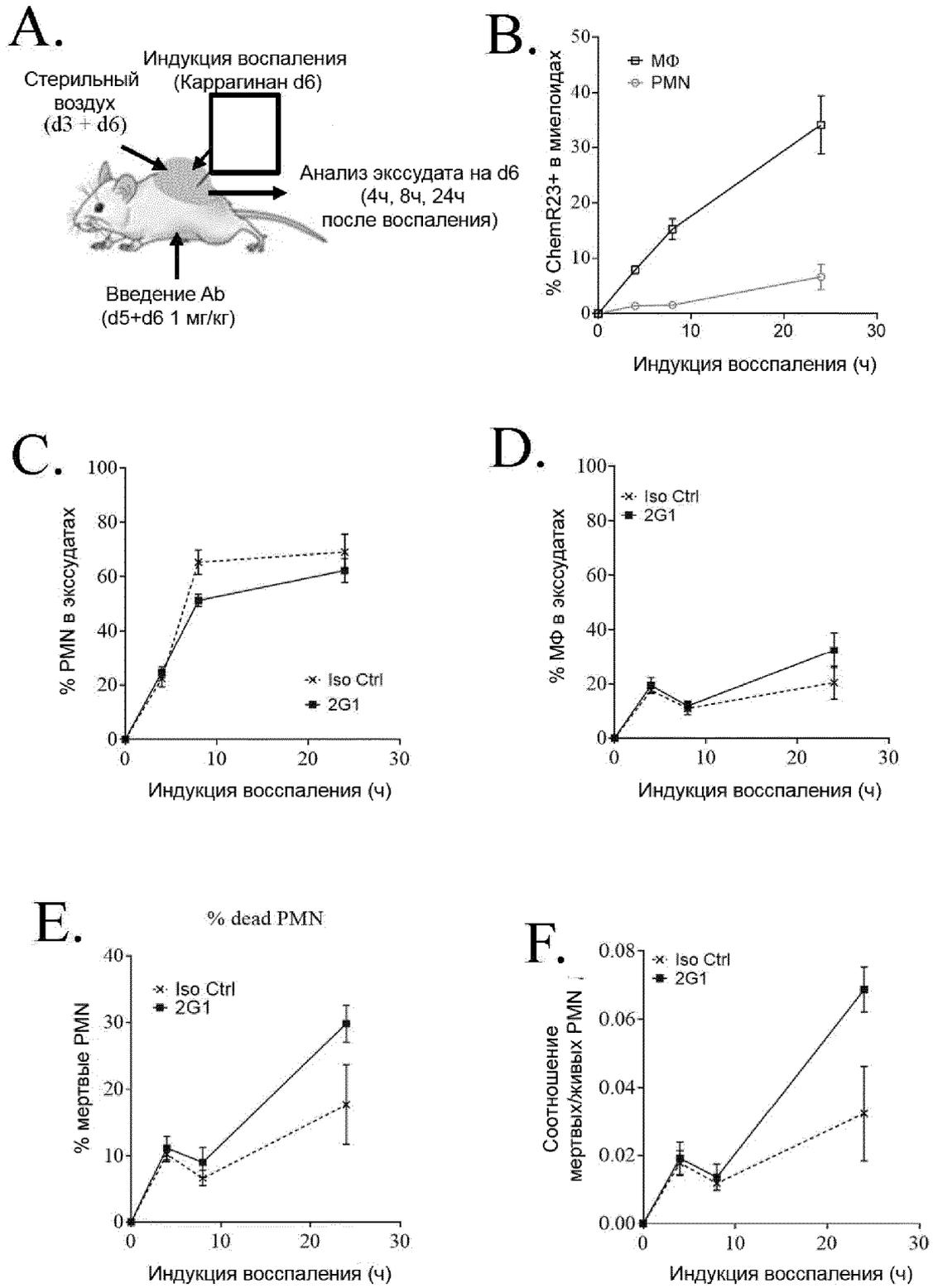
Фиг. 26

С.

Продукция ROS

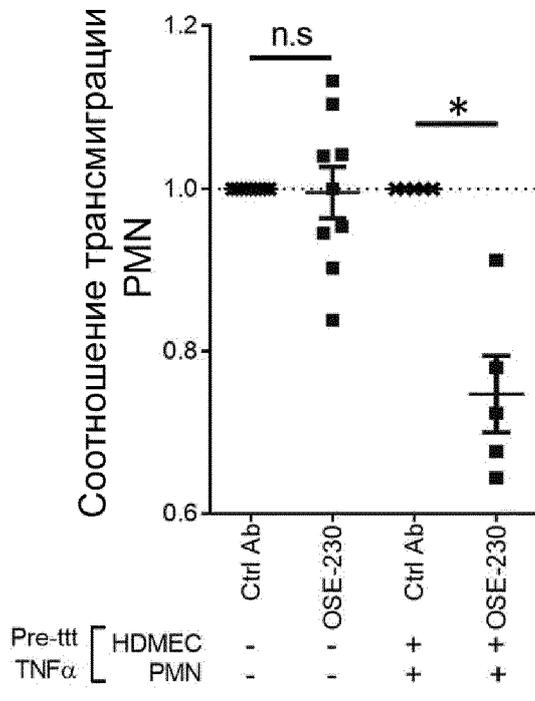


Фиг. 26

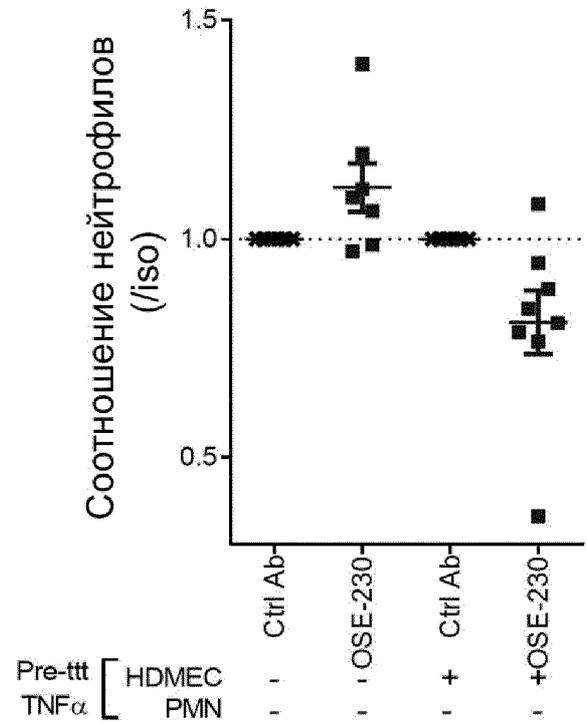


ФИГ. 27

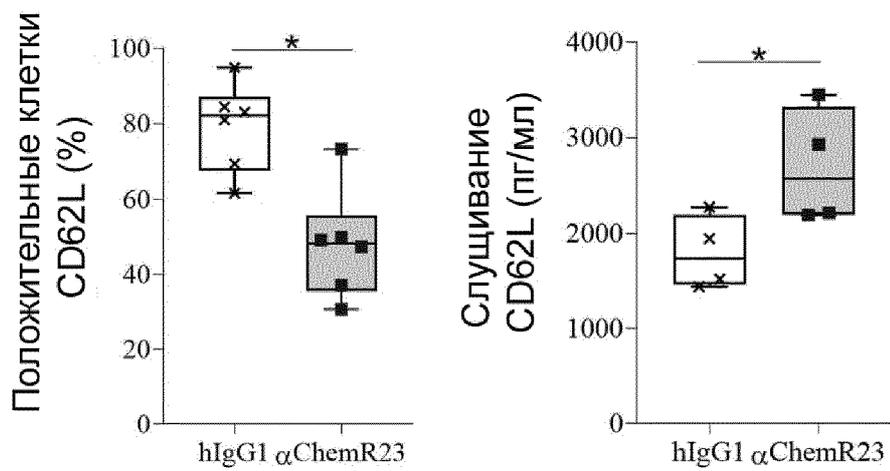
A.



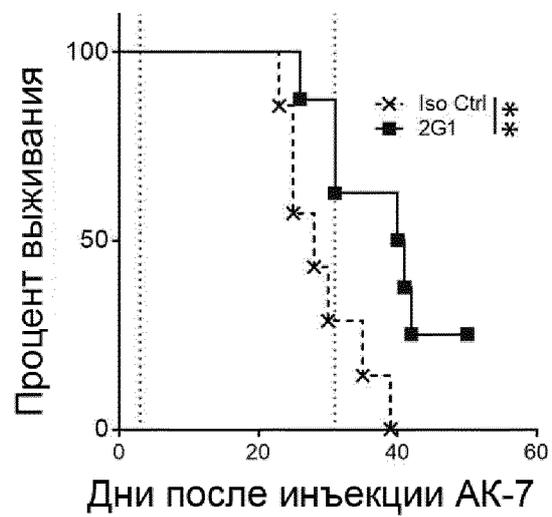
B.



ФИГ. 28

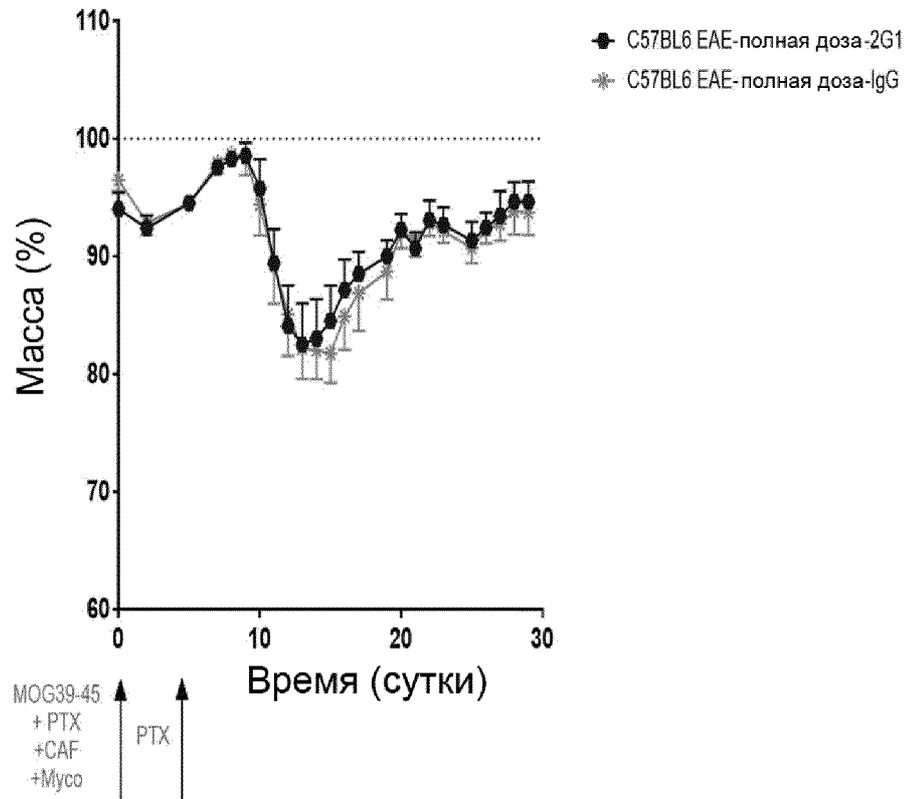


ФИГ. 29

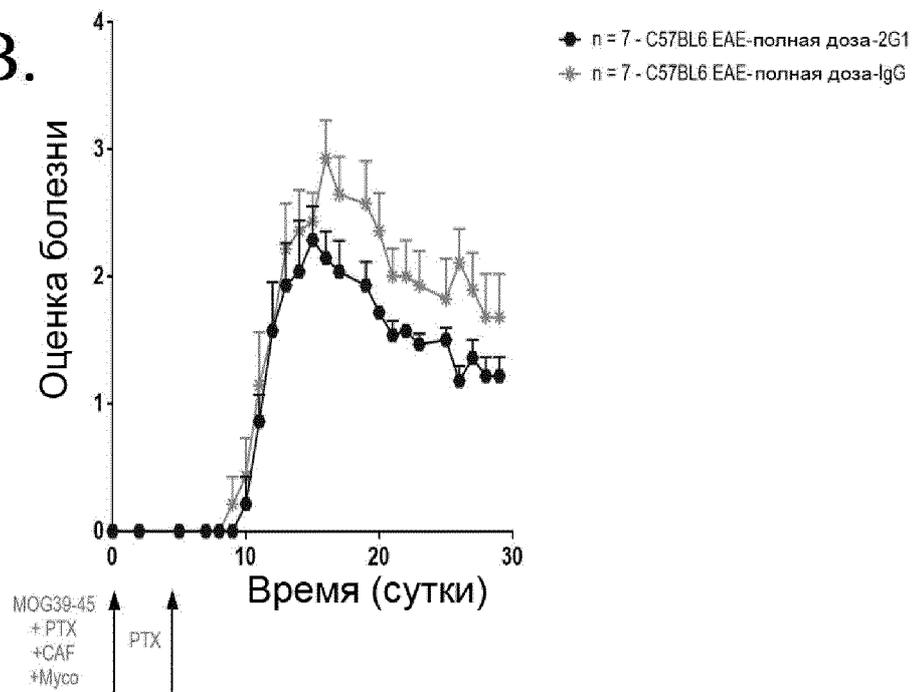


Фиг. 30

А.

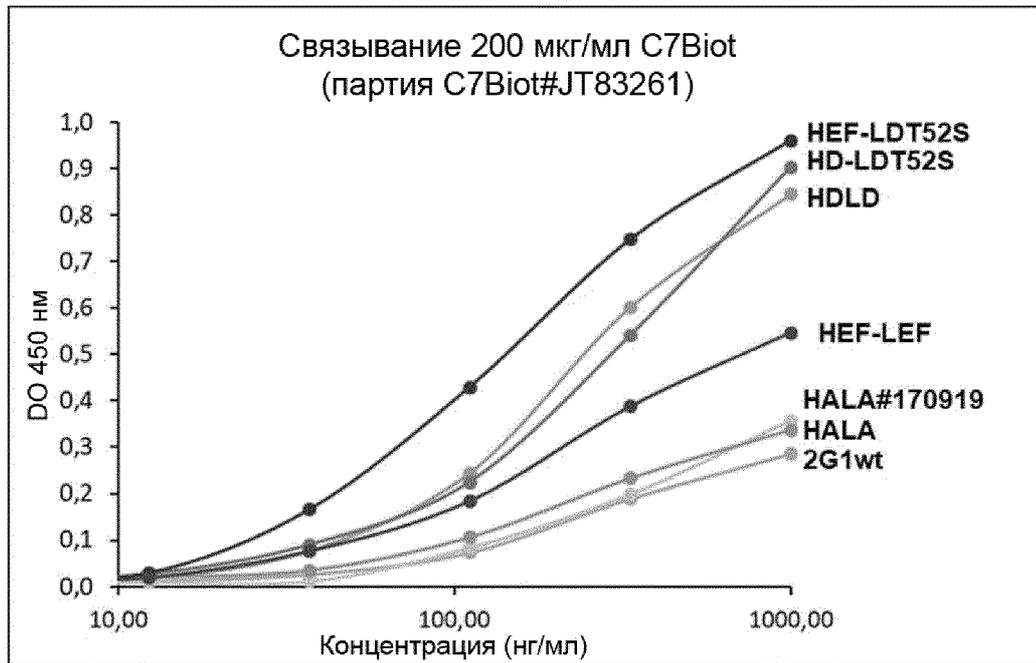


В.



Фиг. 32

A.

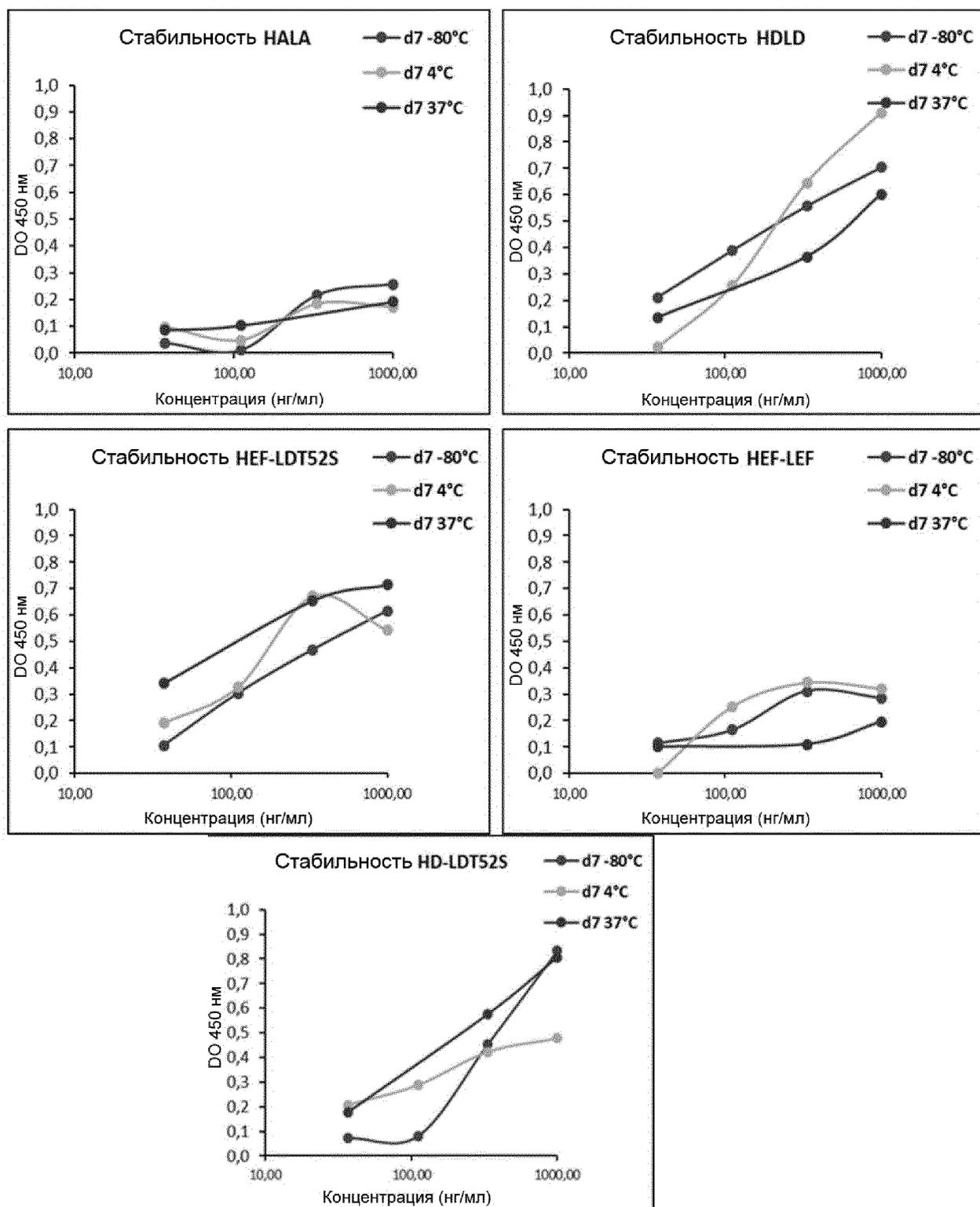


B.

	ED50 (нг/мл)
2G1wt #170919	222,0
HALA#170919	253,4
HALA	194,5
HDLD	192,6
HD-LDT52S	237,4
HEF-LDT52S	125,7
HEF-LEF	182,8

Фиг. 33

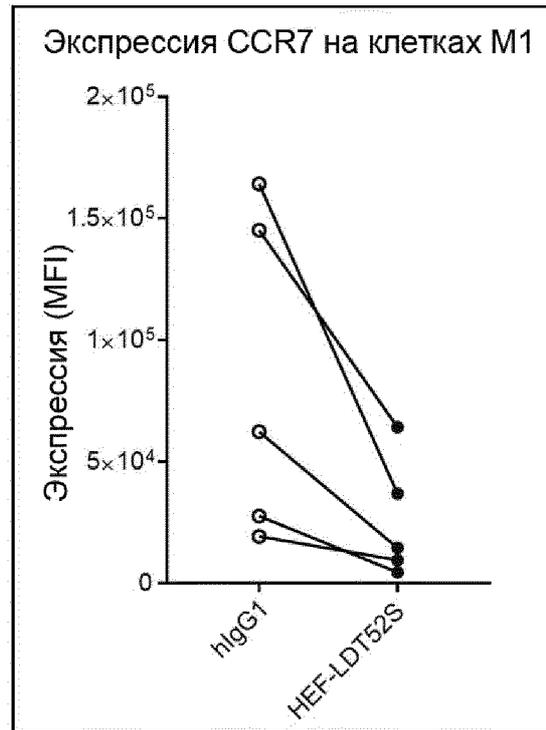
A.



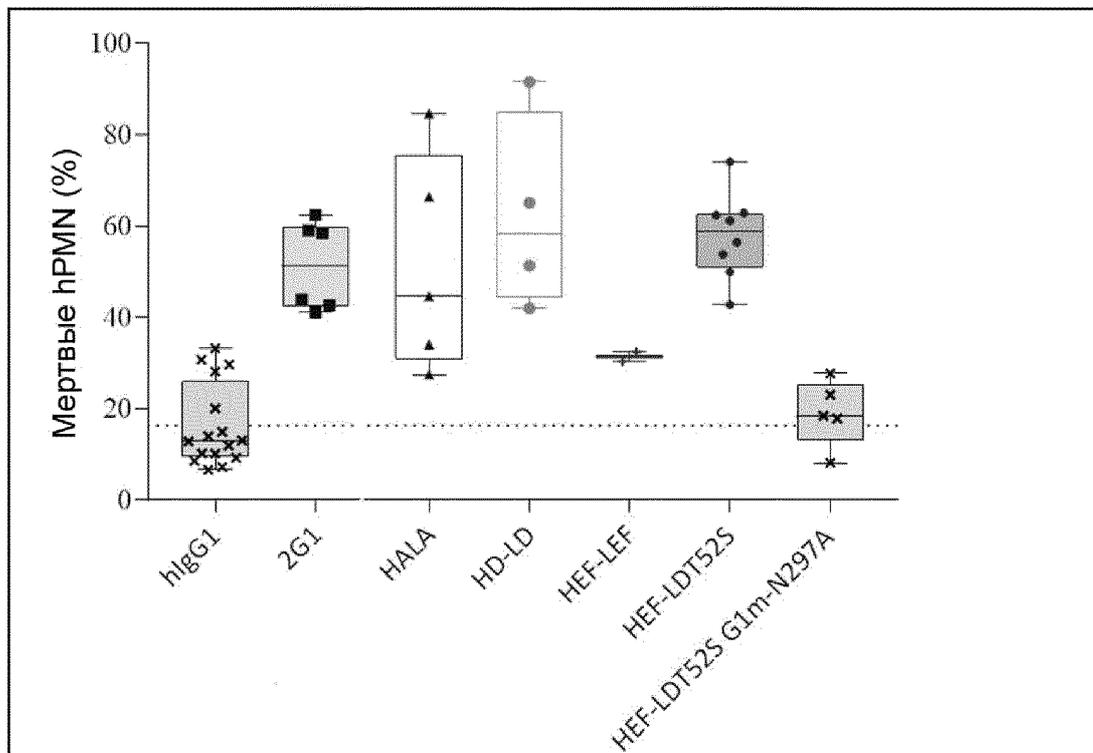
B.

	Загрузка	-80°C		d7 at 37°C	
		% агрегатов	% мономеров	% агрегатов	% мономеров
HDLD	100мкл 0,18 мг/мл	7,9	92,1	5	95
HEF-LDT52S	100мкл 0,15 мг/мл	2,8	97,2	4,3	95,7

Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36