



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.01.17

(21) Номер заявки

201791691

(22) Дата подачи заявки

2016.01.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ НА CD1d

(31) **2014192**

(32) **2015.01.27**

(33) **NL**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/NL2016/050064**

(87) **WO 2016/122320 2016.08.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Ван Дер Влит Йоханнес Йелле,
Де Грюейль Тания Дениз, Верхель
Хендрик Маринус Виллем, Де Брейн
Рене Корнелиа Герарда, Ламерис
Роланд (NL)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2013053021
CHRISTINA G. SIONTOROU: "Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, 1 November 2013 (2013-11-01), page 4215, XP055097777, ISSN: 1176-9114, DOI: 10.2147/IJN.S39428, the whole document

ZHAO-HUI M.A. ET AL.: "CD1d blockade suppresses the capacity of immature dendritic cells to prime allogeneic T cell response", JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 183, no. 2, 22 February 2013 (2013-02-22), pages 894-899, XP055199392, ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/j.jss.2013.01.066, abstract

WHITE T.C. ET AL.: "Antibodies to CD1d enhance thymic expression of invariant NKT TCR and increase the presence of NOD thymic invariant NKT cells", DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, PERGAMON PRESS, US, vol. 32, no. 8, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 943-956, XP022686560, ISSN: 0145-305X, DOI: 10.1016/J.DCI.2008.01.003 [retrieved on 2008-02-11], abstract

ELISA MONZON-CASANOVA ET AL.: "CD1d Expression in Paneth Cells and Rat Exocrine Pancreas Revealed by Novel Monoclonal Antibodies Which Differentially Affect NKT Cell Activation", PLOS ONE, vol. 5, no. 9, 30 September 2010 (2010-09-30), page e13089, XP055183035, DOI: 10.1371/journal.pone.0013089, abstract

YU K.O.A. ET AL.: "The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy", IMMUNOLOGY LETTERS, ELSEVIER BV, NL, vol. 100, no. 1, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 42-55, XP027672130, ISSN: 0165-2478 [retrieved on 2005-08-15], abstract

S.C. YUE ET AL.: "Direct CD1d-Mediated Stimulation of APC IL-12 Production and Protective Immune Response to Virus Infection In Vivo", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 184, no. 1, 30 November 2009 (2009-11-30), pages 268-276, XP055199920, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.0800924, abstract

S.C. YUE ET AL. "CD1d ligation on human monocytes directly signals rapid NF- B activation and production of bioactive IL-12", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 102, no. 33, 16 August 2005 (2005-08-16), pages 11811-11816, XP055199921, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0503366102, abstract

JAMIE ROSSJOHN ET AL.: "Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 12, 16 November 2012 (2012-11-16), pages 845-857, XP055199378, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/nri3328, the whole document

ROELAND LAMERIS ET AL.: "Exploiting the CD1d-iNKT Cell Axis for Potentiation of DC-Based Cancer Vaccines", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 1139, 3 February 2014 (2014-02-03), pages 155-165, XP009185120, ISSN: 1940-6029, the whole document

CÉCILE VINCKE ET AL.: "Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 911, 12 July 2012 (2012-07-12), pages 15-26, XP009185137, ISSN: 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-61779-968-62, the whole document

(57) Изобретение относится к соединениям, конкретно - к полипептидам, которые специфично связываются с неклассическим МНС-белком CD1d и модулируют CD1d-опосредованные биологические функции. Конкретно, изобретение относится к таким соединениям и полипептидам, содержащим или состоящим по меньшей мере из одного однодоменного антитела, где по меньшей

мере одно однодоменное антитело специфично связывается с CD1d. Также предлагаются способы и применение с использованием таких соединений полипептидов и/или однодоменных антител.

042112 B1

042112 B1

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к области иммунологии, более конкретно - к области однодоменных антител, которые связываются с человеческим CD1d, включая антитела, которые модифицируют CD1d-опосредованные биологические функции, такие как активация CD1d-рестриктированных Т-клеток, включая натуральные киллерные Т-клетки (НКТ), и модуляция функции клеток, экспрессирующих CD1d. Например, предлагаются соединения, которые включают по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с CD1d, применение таких соединений, включающих по меньшей мере одно однодоменное антитело, и (фармацевтические) композиции, содержащие такие соединения.

Уровень техники

CD1d является членом CD1-семейства (кластер дифференцировки 1) гликопротеинов (включающих CD1a, CD1b, CD1c, CD1d и CD1e), экспрессируемых на поверхности различных человеческих клеток, включая антигенпрезентирующие клетки (АРС). У человека CD1d кодируется CD1D, который также известен как R3G1. АРС, презентующие CD1d, включают клетки Лангерганса, (активированные) В-клетки, дендритные клетки (например, в лимфатических узлах) и (активированные) моноциты крови. CD1d также экспрессируется различными другими типами клеток, например, в печени, поджелудочной железе, коже, почках, матке, конъюнктиве, эпидидимисе, тимусе и миндалинах (см., например, Sanchis et al. (1992), *Immunology*, 80:561-565).

Клетки, которые активируются/стимулируются с помощью CD1d, включают натуральные киллерные Т-клетки (НКТ-клетки). НКТ-клетки представляют собой гетерогенную группу Т-клеток, которые сочетают свойства как Т-клеток, так и натуральных киллерных клеток. НКТ-клетки представляют собой подгруппу Т-клеток, которые экспрессируют альфа/бета Т-клеточный рецептор (TCR), а также множество молекулярных маркеров, которые обычно ассоциированы с НКТ-клетками.

Тип 1 или инвариантные НКТ-клетки представляют собой наиболее хорошо известную группу НКТ-клеток и отличаются от обычных $\alpha\beta$ -Т-клеток тем, что их Т-клеточные рецепторы гораздо более ограничены в разнообразии ("инвариантны"). НКТ-клетки, включающие эти инвариантные и другие CD1d-рестриктированные Т-клетки (тип 2 НКТ), распознают (свои или чужеродные) липиды и гликолипиды, презентированные с помощью молекул CD1d, присутствующих на АРС. Взаимодействие между (липидпрезентирующим) CD1d и TCR инициирует высвобождение цитокинов, включающих цитокины типа Th1 или Th2, такие как интерферон-гамма, фактор некроза опухоли альфа и интерлейкины, такие как IL-4, IL-5 и IL-13.

Было продемонстрировано, что различные липиды связываются с молекулами CD1d, включающими миколиновые кислоты, диацилглицерины и сфинголипиды. Альфа-галактозилцерамид, KRN7000, является наиболее хорошо изученным лигандом липидсвязывающего CD1d в активации НКТ-клеток *in vitro* и *in vivo*. Другие лиганды включают изоглоботригексозилцерамид, глюкуронозилцерамиды (микробного происхождения), альфа-С-галактозилцерамиды, треитолцерамид и различные (человеческого и другого происхождения) гликолипиды, такие как лизофосфатидилхолин и лизосфингомиелин (см., например, Fox et al. (2009), *PLOS Biology*, 7:10: e1000228).

В настоящее время продемонстрирована важная роль НКТ-клеток в регуляции аутоиммунных, аллергических, противомикробных и противоопухолевых иммунных ответов (van der Vliet et al. (2004), *Clinical Immunology*, 112(1):8-23). Физиологически НКТ-клетки могут усиливать или ингибировать иммунные ответы, включая противоопухолевый, аутоиммунный и противопатогенный ответы, с помощью различных механизмов в зависимости от контекста (Yue et al. (2010), *Journal of Immunology*, 184:268-276), включая индукцию клеточной смерти в клетках множественной миеломы. Состояния, в которые могут быть вовлечены НКТ-клетки, включают аутоиммунные или воспалительные заболевания, включая миастению гравис, псориаз, язвенный колит, первичный билиарный цирроз, колит, аутоиммунный гепатит, атеросклероз и астму. В дополнение к высвобождению цитокинов, эффекторная функция НКТ-клеток, которые приводят к лизису клеток, такие как высвобождение перфорина, высвобождение гранзима и клеточная смерть, также могут быть релевантными в состояниях, в которых участвуют НКТ-клетки, например, таких как злокачественное новообразование. Таким образом, модуляция CD1d-опосредованных эффектов обладает потенциальной терапевтической пользой.

Существует постоянная потребность в соединениях, которые могут связываться и/или взаимодействовать с CD1d настолько специфично, насколько возможно, т.е. минимально или не связываясь с другими членами CD1-семейства как *in vitro*, так и *in vivo*. Конкретно, необходимы такие соединения, которые связывают и/или модулируют (активируют или ингибируют) биологические функции, которые включают CD1d, такие как, но не ограничиваясь ими, активация НКТ-клеток. Такие соединения могут, например, проявлять полезный эффект при различных заболеваниях, в которых играют роль CD1d-опосредованные функции.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагается соединение, включающее по меньшей мере одно однодоменное антитело. Однодоменное антитело связывается с человеческим CD1d. Однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, содержит область CDR1, CDR3 и CDR3 с аминокислотной последовательностью, описанной в настоящем документе, и ее вариантами консервативной последова-

тельности.

Предпочтительно однодоменное антитело содержит область CDR1, CDR2 и CDR3 в комбинации, как описано в настоящем документе, например, как показано в табл. 1.

Еще более предпочтительно однодоменное антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 21.

Соединение по изобретению может представлять собой любое соединение, например комплекс, при условии, что однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, включено в соединение. Предпочтительно соединение представляет собой полипептид. В некоторых воплощениях соединение может состоять только из однодоменного антитела, которое связывается с человеческим CD1d. В других воплощениях соединения состоят из однодоменного антитела, которое связывается с человеческим CD1d, и метки. Еще в одном воплощении соединение может включать однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, связанное с фармацевтическим активным агентом и/или другими антителами.

Также предлагается применение соединения по изобретению при лечении и/или в качестве диагностического агента.

Также предлагается фармацевтическая композиция, которая содержит соединение, как описано в настоящем документе, и нуклеотидные последовательности и клетки-хозяева, содержащие такие нуклеотидные последовательности, которые кодируют соединения по изобретению.

Краткое описание чертежей/фигур

Фиг. 1: CD1d-специфичность индивидуальных выбранных нанотел. Проточную цитометрию использовали для детектирования связывания изотипического контрольного mAb (IgG2b), анти-CD1d 51.1 mAb, R2 отрицательного контроля VHH и индивидуального CD1d-специфического VHH. Данные демонстрируют связывание с CD1a-, CD1b-, CD1c- и CD1d-трансфицированными опухолевыми клеточными линиями (n=3).

Фиг. 2: Индуцирование созревания moDC и продуцирование цитокинов с помощью CD1d-специфичных нанотел. Незрелые moDC культивировали с CD1d-специфичными нанотелами. Через 24 ч супернатанты собирали для детектирования продуцирования цитокинов (ИФА). Через 72 ч moDC анализировали на предмет экспрессии на клеточной поверхности маркера созревания CD83 с использованием проточной цитометрии. NC = отрицательный контроль, PC = положительный контроль, IgG2b = изотипическое контрольное mAb, 51.1 = анти-CD1d 51.1 mAb, LPS = липополисахарид, LPS-PMB = липополисахарид с полимиксином B. Данные представляют среднее значение + SEM, n=3.

Фиг. 3: Ингибирование α -GalCer-индуцированной активации iNKT-клеток. CD1d-трансфицированные клетки HeLa стимулировали в течение ночи с помощью контроля в виде носителя (veh) или α -GalCer (все остальные условия). После промывки клетки HeLa-CD1d, стимулированные носителем или α -GalCer, культивировали в течение 2 ч с использованием изотипического контрольного mAb IgG2b, анти-CD1d 51.1 mAb, отрицательного контроля VHH R2 или нейтрализующего анти-CD1d VHH (VHH 24 (18-29c)), после чего добавляли клетки iNKT. Через 24 ч определяли активацию iNKT-клеток (экспрессия CD25) с использованием проточной цитометрии. Данные представляют среднее значение + SEM из трех экспериментов. Превосходная нейтрализация активации iNKT-клеток с помощью анти-CD1d VHH.

Фиг. 4: Индукция активации iNKT-клеток. CD1d-трансфицированные клетки C1R стимулировали в течение ночи с контролем в виде носителя (veh) или α -GalCer, как указано. После промывки клетки C1R-CD1d, стимулированные носителем или альфа-GalCer, культивировали в течение 2 ч в присутствии или в отсутствие специфического анти-CD1d VHH, после чего добавляли iNKT-клетки. Через 24 ч определяли активацию iNKT-клеток (экспрессия CD25) с использованием проточной цитометрии. Репрезентативные точки проточной цитометрии демонстрируют активацию iNKT-клеток с помощью α -GalCer, но более поразительно после совместного культивирования с анти-CD1d VHH (VHH12 (18-14b)). Данные являются репрезентативными нескольких экспериментов с несколькими CD1d-экспрессирующими опухолевыми клеточными линиями.

Фиг. 5: Индукция связывания аннексина V с помощью анти-CD1d нанотел. Клетки C1R, CD1d-трансфицированные клетки C1R (левая панель) и клетки MM.1s и CD1d-трансфицированные клетки MM.1s (правая панель) культивировали в течение 24 ч с изотипическим контрольным mAb IgG2b, анти-CD1d 51.1 mAb, отрицательным контролем VHH R2 или CD1d-специфичным VHH (VHH19 (19-23G)). Процентное содержание клеток-мишеней, связывающих аннексин V, что является указанием раннего апоптоза, определяли с помощью проточной цитометрии. Данные представляют среднее значение + SEM для трех экспериментов.

Фиг. 6: Индукция активации iNKT-клеток с использованием связанного с планшетом конструкта β 2m-человеческий CD1d (\pm носитель, α -GalCer и/или анти-CD1d VHH). 96-луночные планшеты были покрыты биспецифичным конструктом, состоящим из анти-EGFR VHH, слитого с β 2m-hCD1d (загружали либо вместе с носителем, либо вместе с α -GalCer). Планшеты с покрытием культивировали в течение 2 ч в присутствии или в отсутствие анти-CD1d VHH (VHH12), после чего добавляли iNKT-клетки. Через

24 ч определяли активацию iNKT-клеток (экспрессия CD25) с использованием проточной цитометрии. Репрезентативные точки проточной цитометрии демонстрируют небольшую активацию iNKT-клеток с помощью α 2-galCer-нагруженного β 2m-hCD1d, но надежную активацию после совместного культивирования α 2-galCer-нагруженного β 2m-hCD1d вместе с анти-CD1d VHH (VHH12 (18-14b)).

Фиг. 7: Дозозависимое ингибирование CD1d- α -GalCer-опосредованной активации iNKT-клеток. Экспрессию iNKT CD25, продуцирование IFN- γ и TNF- α определяли после 24-часового совместного культивирования iNKT с CD1d-трансфицированными клетками HeLa, стимулированными с помощью контроля носителя (носитель) или α -GalCer (все остальные условия) и среды (носитель и α -GC), анти-CD1d mAb 51.1 (10 мкг/мл), контрольного VHH (500 нМ) или анти-CD1d VHH (VHH24, 500 нМ). Графическое изображение демонстрирует экспрессию CD25 на iNKT-клетках (а). Эффект зависимости от концентрации анти-CD1d VHH (символы \bullet) и контрольный не ингибирующий, но CD1d-специфичный VHH (символы \blacktriangle) в отношении продуцирования IFN- γ и TNF- α . \blacklozenge указывает контрольные условия с нагрузкой носителя (б). Среднее значение + SD, n=3, **p<0,05, *p<0,01, ****p<0,0001. Тестируемое VHH представляет собой VHH24.

Фиг. 8: Дозозависимая активация iNKT-клеток с помощью анти-CD1d VHH12. CCRF-CEM (T-ALL, CD1d положительные; n=4) и CD1d-трансфицированные MM.1s (множественная миелома; n=3) клетки стимулировали с использованием контроля носителя или α GC, инкубировали с анти-CD1d VHH и контролями и совместно культивировали с iNKT в течение 24 ч, после чего определяли экспрессию iNKT CD25. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (по сравнению с фиг. 4).

Фиг. 9: Индукция дегрануляции iNKT-клеток (слева) и цитотоксичности против CD1d⁺ опухолевых клеточных линий (справа). Клетки CCRF-CEM (CD1d-положительные) стимулировали с использованием контроля носителя или α GC, инкубировали с анти-CD1d VHH и контролями и совместно культивировали с iNKT (соотношение E:T 1:2) в течение указанного времени, составляющего 6, 12 или 18 ч) и окрашивали с помощью CD107a (t=4ч) или аннексина V и 7-AAD для проточной цитометрии. n=5, *p<0,05, ***p<0,001. Показанное анти-CD1d VHH представляет собой VHH12.

Фиг. 10: Индукция цитотоксичности iNKT-клеток против CD1d⁺ первичных клеток множественной миеломы. Размороженные первичные образцы костного мозга от пациентов с ММ стимулировали с контролем носителя или α GC или инкубировали с анти-CD1d VHH и контролями, а затем совместно культивировали с iNKT в течение указанного времени (8 и 16 ч), после чего определяли процент выживших ММ-клеток. Показанное анти-CD1d VHH представляет собой VHH12.

Фиг. 11: Индукция продуцирования цитокинов клетками iNKT с помощью анти-CD1d VHH12. Для детектирования продуцирования цитокинов клетки HeLa-CD1d стимулировали с использованием контроля носителя, OCH (усеченный аналог сфингозина - альфа-галактозилцерамид (альфа-GC), гликолипида, который, согласно сообщениям, индуцировал продуцирование Th2-цитокинов в iNKT-клетках) или α GC, инкубировали с анти-CD1d VHH и контролями и совместно культивировали с iNKT в течение 24 ч, после чего супернатанты анализировали (с помощью анализа Cytometric Bead Assay, CBA). n=4; *p<0,05; ****p<0,0001.

Подробное описание изобретения Определения

В приведенном ниже описании и в примерах используется ряд терминов. Для обеспечения четкого и последовательного понимания описания и формулы изобретения, включая сферу применения этих терминов, приводятся следующие определения. Если иное не определено в настоящем описании, то все технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно используют специалисты в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Раскрытие всех публикаций, патентных заявок, патентов и других ссылок включены в настоящий документ в полном объеме в качестве ссылки.

Способы осуществления стандартных методов, используемых в способах по изобретению, будут очевидны специалисту в данной области. Практическое осуществление стандартных методов в области молекулярной биологии, биохимии, вычислительной химии, клеточных культур, рекомбинантной ДНК, биоинформатики, геномики, секвенирования и в смежных областях хорошо известно специалистам в данной области и обсуждается в руководствах.

В настоящем документе и в его формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используются в их неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за этим глаголом, включены, а элементы, не указанные конкретно, не исключены. Он включает в себя выражения "состоящий по существу из", а также "состоящий из".

Используемые в настоящем описании формы единственного числа включают в себя формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, способ использования соединения включает в себя использование множества этих соединений (например, 10, 100, 1000, 10 тыс., 100 тыс., миллионы или более молекул).

Термин "выравнивание (aligning) и (alignment)" означает сравнение аминокислотных последовательностей двух или более молекул/соединений на основе присутствия коротких или длинных отрезков идентичных или сходных аминокислот. В данной области известно несколько методов выравнивания

аминокислотных последовательностей, которые будут дополнительно описаны ниже.

"Идентичность последовательности" является мерой идентичности нуклеотидных последовательностей или аминокислотных последовательностей. Как правило, последовательности выравнивают таким образом, чтобы получался самый высокий порядок соответствия. "Идентичность" сама по себе имеет признанное в данной области значение и может быть рассчитана с использованием опубликованных методов. Методы, обычно применяемые для определения идентичности или сходства между двумя последовательностями, включают, но не ограничиваются ими, те, которые раскрыты в настоящем руководстве GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988), 48:1073. Методы определения идентичности и сходства могут быть кодифицированы в компьютерных программах. Предпочтительные способы компьютерных программ для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, но не ограничиваются ими, пакет программ GCS (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984), 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. (1990), 215:403). Идентичность последовательности, как раскрыто в настоящем документе, определяли путем вычисления процента сходных аминокислот (количество аминокислот, сходных с эталонной последовательностью, деленное на общее количество аминокислот в эталонной последовательности), по существу, как указано ниже.

В качестве иллюстрации с помощью аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере, например, 70% "идентичности последовательности" с эталонной аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 1, предполагается, что аминокислотная последовательность идентична эталонной последовательности, за исключением того, что полипептидная последовательность может включать до трех изменений аминокислот на каждые из 10 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Следовательно, процент идентичности аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью должен быть рассчитан по всей длине эталонной аминокислотной последовательности. Другими словами, чтобы получить аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичной с эталонной аминокислотной последовательностью, вплоть до 30% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими аминокислотами или аминокислоты в количестве до 30% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить на N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, вразброс либо индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, либо в одной или в нескольких смежных группах внутри эталонной последовательности.

Термины "аминокислотная последовательность", или "белок", или "пептид" относятся к молекулам, состоящим из цепи аминокислот, без ссылки на конкретный механизм действия, размер, трехмерную структуру или происхождение. Их "фрагмент" или "часть" может, таким образом, по-прежнему называться "аминокислотной последовательностью", или "белком", или "пептидом". "Выделенная аминокислотная последовательность" используется для обозначения аминокислотной цепи с определенной последовательностью и больше не находится в исходной природной среде, например *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или человеческой клетке-хозяине.

Каждая молекула иммуноглобулина имеет вариабельный домен. Вариабельный домен молекул иммуноглобулинов подразделяется на гипервариабельную (HV) и каркасную (FR) области. Области HV имеют высокое соотношение различных аминокислот в заданном положении по отношению к наиболее распространенной аминокислоте в этом положении. Области гипервариабельности обозначаются как области, определяющие комплементарность (CDR). Молекулы иммуноглобулинов содержат три области, определяющие комплементарность, (CDR1, CDR2 и CDR3). Четыре каркасные области с гораздо менее вариабельными аминокислотными последовательностями отделяют области CDR. Области CDR могут непосредственно связываться с антигеном, таким как CD1d.

Описание

Настоящее изобретение в целом относится к соединениям, включающим однодоменные антитела, которые связываются с человеческим CD1d. Авторы настоящего изобретения обнаружили однодоменные антитела и их антигенсвязывающие части, которые связываются с человеческим CD1d.

В первом аспекте предлагается соединение, включающее по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43.

Как описано выше, CD1d (Entrez Gene ID 912, NCBI Reference Sequence: NP_001757; Balk et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:252-256) экспрессируется в различных клетках, включая В-клетки у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, гепатоцитах, дендритных клетках и опухолевых клетках, и описанные в настоящем документе однодоменные антитела могут быть использованы для связывания с CD1d, например, но не ограничиваясь связыванием с CD1d, на любых из этих клеток или для

связывания с CD1d на других клетках, экспрессирующих CD1d, или для связывания с молекулами CD1d, которые не связаны с клетками и которые либо не связаны с чем-либо, либо, например, связаны или ассоциированы с носителями, полимерами или другими белками.

Соединение, включающее однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, может относиться к любому типу соединения или комплекса при условии, что оно включает однодоменное антитело, которое связывается с CD1d.

Предпочтительно соединение согласно изобретению может связываться с человеческим CD1d благодаря наличию однодоменного антитела, которое связывается с человеческим CD1d.

Соединение согласно изобретению может дополнительно включать другие функциональные или нефункциональные группы.

Например, однодоменное антитело по настоящему изобретению может быть связано с наночастицей, липосомой, вирусом, меткой, другим антителом или белковой структурой (например, рецептором) или может быть слито с антигеном, пептидом, лекарственным средством, маркером или нуклеиновой кислотой. Например, соединение может также включать магнитный шарик, позволяющий выделить CD1d-экспрессирующие клетки.

Однодоменное антитело CD1d может быть связано через карбоксильный или N-конец антитела или может быть связано с сайтом, отличным от карбоксильного или N-концевого.

Присоединение к однодоменному антителу CD1d может быть прямым, т.е. без какой-либо промежуточной последовательности, или через аминокислотную последовательность линкера, молекулу линкера или химическую связь. Например, соединение может быть физического и/или химического типа.

В одном воплощении соединение представляет собой биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело. В одном воплощении соединение представляет собой двухвалентное антитело или мультиспецифичное антитело. Двухвалентность или мультиспецифичность могут позволить антителам связываться с мультимерным антигеном с большой avidностью; биспецифичность или мультиспецифичность могут позволить сшивку двух антигенов.

Соединение включает по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43.

Однодоменные антитела (sdAb, также называемые нанотелом от Ablynx, "developer" или VHH) хорошо известны специалисту. Однодоменными антителами являются антитела, чьи области, определяющие комплементарность, являются частью однодоменного полипептида. Однодоменные антитела, таким образом, содержат одну область, определяющую комплементарность (CDR) 1 (CDR1), одну CDR2 и одну CDR3. Примерами однодоменных антител являются антитела, содержащие только тяжелую цепь, антитела, которые в естественной среде не содержат легкие цепи, однодоменные антитела, полученные из обычных антител, и сконструированные антитела.

Однодоменные антитела могут быть получены из любых видов, включая мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика и быка. Например, природные молекулы VHH могут быть получены из антител, выращенных в животных видах Camelidae, например в верблюдах, дромедарах, альпаках и гуанако.

Как и цельное антитело, однодоменное антитело способно селективно связываться со специфическим антигеном. Однодоменные антитела могут содержать только вариабельный домен цепи иммуноглобулина, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 и каркасные области. С молекулярной массой всего примерно 12-15 кДа, нанотела намного меньше, чем обычные антитела (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности могут подвергаться обмену между видами. Например, из молекулы иммуноглобулина ламы могут быть выбраны CDR-последовательности и подвергнуты обмену с CDR-последовательностями в молекулах иммуноглобулина человека, с получением молекулы иммуноглобулина человека, имеющей специфичность, которая является производной CDR-последовательностей ламы. Это может быть предпочтительным, поскольку человеческая последовательность может быть менее иммуногенной для человека по сравнению с исходной каркасной последовательностью ламы. Такой обмен CDR-последовательностей известен как гуманизация.

Следовательно, молекулы иммуноглобулина согласно изобретению могут иметь последовательности иммуноглобулина человеческого происхождения или последовательности иммуноглобулина с происхождением из ламы и могут иметь последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, замененные последовательностями CDR согласно изобретению, для обеспечения связывания человеческого CD1d. Другими словами, соединение согласно изобретению может включать гуманизованное однодоменное антитело с CDR, как описано в настоящем документе. Например, однодоменное антитело может иметь человеческие каркасные последовательности и CDR-области, как описано в настоящем документе.

Однодоменное антитело, которое включено в соединение согласно изобретению, содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность,

довательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 22, и CDR2, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43.

Последовательность SEQ ID NO: 22 соответствует последовательности CDR1 однодоменного антитела, обозначенного как 17-1E в табл. 1 настоящего документа. Для целей настоящего изобретения однодоменное антитело 17-1E может также упоминаться как VHH номер 1. Последовательность однодоменного антитела 17-1E показана как SEQ ID NO: 1 и содержит в дополнение к последовательностям CDR1, CDR2 и CDR3, как показано в табл. 1, также каркасные последовательности.

Последовательность с SEQ ID NO: 43 соответствует последовательности CDR2 однодоменного антитела, обозначенного как 17-1E в табл. 1 настоящего документа.

Для всех однодоменных антител, описанных в настоящем документе и, например, перечисленных в табл. 1, область перед CDR1 может упоминаться как каркасная область (FW) 1, область между CDR1 и CDR2 может упоминаться как FW2, область между CDR2 и CDR3 может упоминаться как FW3, а область после CDR3 может упоминаться как FW4. Соответствующие индивидуальные каркасные области FW1, FW2, FW3 или FW4 могут быть легко установлены на основе последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 и цельного однодоменного антитела и поэтому раскрыты как таковые.

Неожиданно было обнаружено, что могут быть получены различные однодоменные антитела, которые обладают высокой идентичностью с аминокислотной последовательностью по отношению к CDR1 и CDR2 различных однодоменных антител. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 обнаруженных однодоменных антител приведены в табл. 1. Например, однодоменное антитело, обозначенное как 19-23G в табл. 1, содержит VHH номер 19 и имеет комбинацию CDR1 с последовательностью, которая соответствует SEQ ID NO: 37, CDR2 с последовательностью, которая соответствует SEQ ID NO: 58, и CDR3 с последовательностью, которая соответствует SEQ ID NO: 79. Цельная последовательность, включающая каркасные области этого VHH, представляет собой SEQ ID NO: 16.

Однако согласно изобретению однодоменное антитело может содержать любую комбинацию CDR1, CDR2 и CDR3 при условии, что CDR1 демонстрирует по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43. Например, также предполагается, что однодоменное антитело содержит CDR1, как показано в табл. 1, первого VHH (например, VHH номер 10) и CDR2, как показано в табл. 1, второго VHH (например, VHH номер 20).

Другими словами, будет понятно, что на основе настоящего описания специалист в данной области может, не утруждаясь, предоставить соединения согласно изобретению, включающие по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где CDR1 однодоменного антитела содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2 однодоменного антитела содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, например, на основе различных CDR1 и CDR2, представленных в табл. 1.

В предпочтительном воплощении CDR1 по всей его длине демонстрирует по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22. В предпочтительном воплощении CDR2 по всей его длине демонстрирует по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43. Предпочтительный CDR1 по всей своей длине демонстрирует по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43.

Предпочтительно CDR1 и/или CDR2 демонстрируют по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 90, 95, 97 и 99% идентичности соответственно с SEQ ID NO: 22 и/или SEQ ID NO: 43.

Также предлагается соединение, включающее по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, и где CDR1 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 64; или где CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 42, CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 63, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 84.

Было обнаружено, что внутри предложенных однодоменных антител, которые могут быть включены в соединение согласно настоящему изобретению, присутствует группа, которая отображает для CDR1 аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, для CDR2 аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, и для CDR3 - аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 64. Эти

однодоменные антитела обладают высокой степенью идентичности в отношении соответствующих областей, определяющих комплементарность. В предпочтительном воплощении CDR1 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22. В предпочтительном воплощении CDR2 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43. В предпочтительном воплощении CDR3 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 64. Предпочтительно CDR1 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, CDR2 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 80% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 43, и CDR3 по всей ее длине демонстрирует по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 64. Предпочтительно CDR1 демонстрирует по меньшей мере 90, 92, 95, 97 и 99% идентичности с SEQ ID NO: 22, CDR2 демонстрирует по меньшей мере 80, 82, 85, 90, 92, 95, 97 и 99% идентичности с SEQ ID NO: 43, и CDR3 демонстрирует по меньшей мере 70, 72, 75, 78, 80, 82, 85, 90, 92, 95, 97 и 99% идентичности с SEQ ID NO: 64.

Согласно изобретению в предпочтительном воплощении однодоменное антитело может содержать любую комбинацию CDR1, CDR2 и CDR3 при условии, что CDR1 демонстрирует по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, и CDR3, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности с SEQ ID NO: 64. Например, также предполагается, что однодоменное антитело содержит CDR1, как показано в табл. 1, первого VHH (например, VHH номер 10, SEQ ID NO: 31), и CDR2, как показано в табл. 1, второго VHH (например, VHH номер 20, SEQ ID NO: 59), и CDR3, как показано в табл. 1, первого VHH, или второго VHH, или третьего VHH (например, VHH № 21, SEQ ID NO: 81).

Другими словами, будет понятно, что на основании настоящего раскрытия в предпочтительном воплощении специалист в данной области может, не утруждаясь, предоставить соединения согласно изобретению, включающие по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, путем комбинирования различных CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 однодоменного антитела содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и CDR2 однодоменного антитела содержит аминокислоту последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, и CDR3 однодоменного антитела содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 64, например, на основе различных CDR1, CDR2 и CDR3, показанных в табл. 1.

В другом предпочтительном воплощении предложено соединение, включающее по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 42, CDR2, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 63, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 84.

Предпочтительно предлагается соединение, включающее по меньшей мере одно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, как описано в настоящем документе, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации в табл. 1, или их варианты консервативной последовательности.

Хотя будет понятно, что специалист в данной области сможет предоставить различные однодоменные антитела на основе различных CDR1, CDR2, CDR3, как описано в настоящем документе, а также другие предоставленные последовательности (включая различные каркасные последовательности и полноразмерную последовательность однодоменных антител), n однодоменное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3, как показано в комбинации в табл. 1, и их варианты консервативной последовательности. Другими словами, соединение согласно изобретению включает однодоменное антитело, где n CDR1 и CDR2 и CDR3 относятся к одному и тому же VHH, как показано в табл. 1. Например, однодоменное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 того же VHH, как показано в табл. 1, например VHH1, VHH2, VHH3, ..., VHH14, VHH18, VHH 19, ..., VHH24. Было обнаружено, что, в частности, CDR1, CDR2 и CDR3, как показано в комбинации (т.е. из одного и того же VHH), демонстрируют предпочтительное связывание CD1d. Как будет понятно специалисту в данной области, также включены варианты консервативной последовательности комбинаций CDR1, CDR2 и CDR3, как описано в табл. 1.

Действительно, при определении степени идентичности последовательности между двумя аминокислотными последовательностями или при создании комбинации CDR1, CDR2 и CDR3 в однодоменном антителе специалист в данной области может принимать во внимание так называемые "консервативные" аминокислотные замены, которые могут в целом быть описаны как аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком с аналогичной химической структурой, который мало влияет или практически не влияет на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Такие консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной

области, например, из WO 04/037999, WO 00/46383, WO 01/09300 и WO 04/037999. Консервативные замены предпочтительно представляют собой замены, в которых одна аминокислота в следующих группах (a)-(e): аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком в той же группе (a)-(e):

- (a) малые алифатические, неполярные или слабо полярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly;
- (b) полярные, отрицательно заряженные остатки и их (незаряженные) амиды: Asp, Asn, Glu и Gln;
- (c) полярные положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys;
- (d) крупные алифатические, неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys;
- (e) ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp.

Предпочтительными примерами консервативных замен являются следующие:

- Ala в Gly или Ser; Arg в Lys; Asn в Gln или в His;
- Asp в Glu; Cys в Ser, Gln в Asn; Glu в Asp;
- Gly в Ala или в Pro; His в Asn или в Gln;
- Ile в Leu или в Val; Leu в Ile или в Val;
- Lys в Arg, в Gln или в Glu; Met в Leu, в Tyr или в Ile;
- Phe в Met, в Leu или в Tyr, Ser в Thr;
- Thr в Ser, Trp в Tyr; Tyr в Trp и/или
- Phe в Val, в Ile или в Leu.

Предпочтительно однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, перечисленные в комбинации в табл. 1, включая их варианты консервативной последовательности. Более п однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, перечисленные в комбинации в табл. 1.

Также предлагается соединение, раскрытое в настоящем документе и выше, где соединение содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 21 или их вариантов консервативной последовательности.

Другими словами, предпочтительно однодоменное антитело, включенное в соединение согласно изобретению, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 21 или, как объяснено выше, из их вариантов консервативной последовательности. Эти последовательности 1-22 представляют собой однодоменные антитела с CDR1, CDR2 и CDR3, как показано в комбинации в табл. 1, включая каркасные области.

Эти однодоменные антитела обладают свойствами связывания с CD1d, как подробно описано в примерах, раскрытых в настоящем документе. SEQ ID NO: 1 соответствует VHH № 1; SEQ ID NO: 2 соответствует VHH № 2; SEQ ID NO: 3 соответствует VHH № 3; SEQ ID NO: 4 соответствует VHH № 4; SEQ ID NO: 5 соответствует VHH № 5; SEQ ID NO: 6 соответствует VHH № 6; SEQ ID NO: 7 соответствует VHH № 7; SEQ ID NO: 8 соответствует VHH № 8; SEQ ID NO: 9 соответствует VHH № 9; SEQ ID NO: 10 соответствует VHH № 10; SEQ ID NO: 11 соответствует VHH № 11; SEQ ID NO: 12 соответствует VHH № 12; SEQ ID NO: 13 соответствует VHH № 13; SEQ ID NO: 14 соответствует VHH № 14; SEQ ID NO: 15 соответствует VHH № 18; SEQ ID NO: 16 соответствует VHH № 19; SEQ ID NO: 17 соответствует VHH № 20; SEQ ID NO: 18 соответствует VHH № 21; SEQ ID NO: 19 соответствует VHH № 22; SEQ ID NO: 20 соответствует VHH № 23; и SEQ ID NO: 21 соответствует VHH № 24, как показано в табл. 1.

Также предлагаются однодоменные антитела, включенные в соединение согласно изобретению и имеющие по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 92, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-21, по всей ее длине (и применимо для всей описанной в настоящем документе последовательности).

Хотя соединение согласно изобретению может представлять собой любое соединение, включающее однодоменное антитело, которое связывается с CD1d, в предпочтительном воплощении соединение представляет собой полипептид, к которому присоединен фармацевтический активный агент, или метка, или маркер. Например, полипептид, содержащий CD1d-связывающее однодоменное антитело, может быть связан с фармацевтическим активным агентом, который предпочтительно доставляется в CD1d-экспрессирующую клетку. Другой пример включает соединение согласно изобретению, которое включает CD1d-связывающее однодоменное антитело и антиген. Такие соединения могут найти применение, например, в вакцинах на основе дендритных клеток. Активный агент может быть связан с соединением согласно изобретению, предпочтительно с полипептидом согласно изобретению, что позволяет высвободить агент на месте его доставки. Другой пример - это где соединение согласно изобретению, например полипептид согласно изобретению, содержит метку. Метка может быть, например, в виде флуоресцентной или радиоактивной метки, но не ограничиваясь ими. Метка любого вида, которая позволяет детектировать присутствие или локализацию соединения согласно изобретению, может быть целесообразно использована в контексте изобретения. В другом воплощении, соединение представляет собой полипептид.

Однако и, кроме того, в другом предпочтительном воплощении изобретения предлагается соедине-

ние согласно любому из предыдущих абзацев, где соединение включает дополнительные однодоменные антитела, где соединение содержит метку, где фармацевтический активный агент связан с соединением, где однодоменное антитело является гуманизированным, где соединение представляет собой биспецифичное или мультиспецифичное соединение (биспецифичность или мультиспецифичность могут допускать сшивку двух антигенов), где соединение представляет собой двухвалентное или многовалентное соединение (двухвалентность или мультивалентность могут позволить антителам связываться с мультимерным антигеном с большей avidностью), где соединение слито с антигеном, пептидом или нуклеотидной последовательностью, где соединение представляет собой липосому, вирус и/или где соединение представляет собой наночастицу.

Также предлагается соединение, раскрытое в настоящем документе, где однодоменное антитело связывается с человеческим CD1d, но не с человеческим CD1a, человеческим CD1b и/или человеческим CD1c. Другими словами, в соответствии с конкретным назначением соединение согласно изобретению включает однодоменное антитело, которое специфично связывается с человеческим CD1d, но не связывается с человеческими CD1a, CD1b и/или CD1c. Предпочтительно соединение согласно изобретению связывается с человеческим CD1d, но не связывается с человеческими CD1a, CD1b и/или CD1c. Однодоменные антитела, представленные с помощью SEQ ID NO: 1-21, являются примерами однодоменных антител, которые специфично связываются с человеческим CD1d. Специалист в данной области знает, как без особого труда определить, является ли однодоменное антитело специфичным для человеческого CD1d, что можно наблюдать из примеров.

Как упоминалось в настоящем документе, неожиданно было обнаружено, что могут быть предложены соединения, включающие CD1d-связывающие однодоменные антитела, которые имеют среди них высокую аминокислотную идентичность по отношению к последовательностям CDR1, CDR2 и/или CDR3. Кроме того, было обнаружено, что могут быть предусмотрены соединения, включающие однодоменные антитела, как описано в настоящем документе, с различными функциональными характеристиками и особенностями, как можно наблюдать из примеров. Таким образом, в настоящем документе также предлагается соединение, как описано здесь, где соединение способно индуцировать созревание дендритных клеток, предпочтительно дендритных клеток, полученных из моноцитов, предпочтительно, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH2 или VHH5 в табл. 1 или их варианты консервативной последовательности, или где однодоменное антитело представляет собой VHH2 или VHH5 или их варианты консервативной последовательности; и/или соединение способно ингибировать индуцированную гликолипидом, например альфа-галактозилцерамидом, активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, таких как инвариантные натуральные киллерные Т-клетки, предпочтительно, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH5 или VHH24 в табл. 1, или их варианты консервативной последовательности, или где однодоменное антитело представляет собой VHH5 или VHH24 или их варианты консервативной последовательности; и/или соединение способно индуцировать активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, таких как инвариантные натуральные киллерные Т-клетки, и/или стимулировать гликолипид-индуцированную (например, альфа-галактозилцерамидом) активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, таких как инвариантные натуральные киллерные Т-клетки, предпочтительно, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH12 в табл. 1, или их варианты консервативной последовательности, или где однодоменное антитело представляет собой VHH12 или их варианты консервативной последовательности; и/или соединение способно индуцировать связывание аннексина V (например, связывание аннексина V с клетками, которые контактировали с таким соединением; связывание с аннексином V является маркером раннего апоптоза) и/или апоптоз в CD1d-экспрессирующих клетках, предпочтительно CD1d-экспрессирующей опухоли, предпочтительно, когда однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH3, VHH6, VHH8 или VHH19 в табл. 1 или их варианты консервативной последовательности, или где однодоменное антитело представляет собой VHH3 или VHH6 или VHH8 или VHH19 или их варианты консервативной последовательности.

Было обнаружено, что однодоменные антитела VHH2 и VHH5 с CDR, как показано в табл. 1, демонстрируют активность в отношении индуцирования созревания дендритных клеток, предпочтительно дендритных клеток, полученных из моноцитов (см. "Примеры"), а также в отношении продуцирования цитокинов, примером которых является IL-12. Соединения, включающие такие однодоменные антитела, полезны для индуцирования созревания дендритных клеток и продуцирования цитокинов, например продуцирования IL-12, *in vitro* или *in vivo*, например, при лечении злокачественных новообразований, малярии и ВИЧ и/или в качестве противомикробного или противовирусного агента. Кроме того, CD1d-стимулирование на дендритных клетках может быть полезно в подходах вакцинации, как обсуждалось в настоящем документе (см., например, Yue et al. (2010), *J. Immunol.* 184(1):268-76; Yue et al. (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(33):11811-6; Teng et al. (2009), *J. Immunol.* 182(6):3366-71; или Teng et al. (2009), *J. Immunol.* 183(3):1911-20).

Кроме того, было обнаружено (см. "Примеры"), что может быть предложено соединение согласно изобретению, которое способно ингибировать индуцированную гликолипидом, т.е. всеми гликолипидами, которые могут быть связаны/презентированы с помощью CD1d, например индуцированную альфа-галактозилцерамидом активацию CD1d-рестриктированной Т-клетки, такой как инвариантная натуральная киллерная Т-клетка, предпочтительно, когда однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено для VHH5 или VHH24 в комбинации в табл. 1, или их варианты консервативных последовательностей. Соединения, включающие такие однодоменные антитела, пригодны для ингибирования индуцированной гликолипидом (например, альфа-галактозилцерамидом) активации CD1d-рестриктированной Т-клетки (включая инвариантную натуральную киллерную Т-клетку) как *in vitro*, так и *in vivo*, например, в исследованиях и/или для терапевтических iNKT-клеток (инвариантные натуральные киллерные Т-клетки) или других подгрупп CD1d-рестриктированных Т-клеток из хронического сверхстимулирования (см., например, Terabe et al. (2014), *Cancer Immunol. Immunother.* 63(3):199-213).

Кроме того, предлагается соединение по изобретению, которое способно индуцировать активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, включая инвариантные натуральные киллерные Т-клетки, и/или стимулировать индуцированную гликолипидом (например, альфа-галактозилцерамидом) активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, включая инвариантные натуральные киллерные Т-клетки, предпочтительно, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH12 в табл. 1, или их варианты консервативной последовательности. Соединения, включающие такие однодоменные антитела, пригодны для индуцирования активации инвариантных натуральных киллерных Т-клеток в отсутствие экзогенно добавленных гликолипидов и/или для стимулирования индуцированной гликолипидом (включая альфа-галактозилцерамид) активации инвариантных натуральных киллерных Т-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, например, при лечении злокачественного новообразования. iNKT-клетки могут вызывать опухолевую цитотоксичность посредством (1) прямого лизиса опухолевых клеток или посредством (2) продуцирования иммунорегуляторных цитокинов (например, после взаимодействия с DC), таких как IFN- γ , которые вызывают вторичные иммунные эффекторы, такие как NK-клетки, цитотоксические Т-клетки, для оказания противоопухолевого эффекта. Это рассмотрено, например, в публикации Schneiders et al. (2011), *Clin. Immunol.* 140(2):130-41.

Кроме того, предлагается соединение согласно изобретению, которое может связываться с конструктором направленного воздействия на CD1d, позволяющим направленное воздействие и направленную активацию iNKT-клеток в опухолевом сайте, предпочтительно, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH12 в табл. 1, или их варианты консервативных последовательностей, предпочтительно, где однодоменным антителом является VHH12. Это применяется и основано на подходе, предложенном Stirnemann K. et al. *J. Clin. Invest.* 2008 Mar; 118(3):994-1005.

Также предлагается соединение, которое способно индуцировать увеличение связывания аннексина V, что является указанием раннего апоптоза, и/или способно индуцировать апоптоз в CD1d-экспрессирующих клетках, предпочтительно CD1d-экспрессирующей опухоли, предпочтительно, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации для VHH3, VHH6, VHH8 или VHH19 в табл. 1, или их варианты консервативных последовательностей. Соединения, включающие такие однодоменные антитела, пригодны для индуцирования увеличения связывания аннексина V и/или апоптоза в CD1d-экспрессирующих клетках как *in vitro*, так и *in vivo*, например, при лечении злокачественного новообразования. Это применимо, например, для CD1d⁺ злокачественных новообразований, где это может привести к клеточной смерти, например при множественной миеломе (*Blood.* 2009 Mar 12; 113(11):2498-507).

Также предлагается применение таких соединений, включающих однодоменные антитела, с различными функциональными группами, как описано выше, например, при лечении состояния, при котором такая функциональность является полезной.

Еще в одном предпочтительном воплощении предлагается соединение, как описано в настоящем документе, где соединение представляет собой однодоменное антитело, предпочтительно, где соединение представляет собой однодоменное антитело, которое имеет области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как перечислено в комбинации в табл. 1, или их варианты консервативных последовательностей, или где однодоменное антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 21 или их вариантов консервативных последовательностей.

Также предлагается соединение, включающее антитело, предпочтительно однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где антитело, предпочтительно однодоменное антитело, содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80, 90, 95 или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3, как показано для VHH № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20,

21, 22, 23 или 24, как показано в табл. 1. Предпочтительно соединение, включающее антитело, предпочтительно однодоменное антитело, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80, 90, 95 или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью VHH № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, как показано в табл. 1, или с их вариантами консервативных последовательностей. Предпочтительно соединение представляет собой антитело, п одноцепочечное антитело. Каждое из специфических антител, представленных в табл. 1, или антитела содержат CDR1, CDR2, CDR3, как показано в комбинации (т.е. на VHH номер), имеют удивительные и неожиданные свойства, как продемонстрировано в примерах и описании. Также предлагаются нуклеиновая кислота или вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту, кодирующую CDR1, CDR2 и/или CDR3, антитело, однодоменное антитело или соединение согласно изобретению, как описано в настоящем документе.

Как будет понятно специалисту в данной области, соединения, описанные в настоящем документе, могут иметь широкое применение, в том числе в качестве инструмента исследования, в качестве диагностического инструмента, в качестве средства доставки к сайту-мишени (экспрессирующему CD1d), например, лекарственного средства как *in vitro*, так и *in vivo*, в направленном воздействии на два или более различных рецептора, молекул и/или антигенов (например, когда соединение является биспецифичным или мультиспецифичным) как *in vitro*, так и *in vivo* и т.д. Предпочтительно соединение, как описано в настоящем документе, предназначено для применения в лечении или для применения *in vivo* в качестве диагностического агента. Состояния, которым может быть полезно соединение, описанное в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, злокачественное новообразование, ВИЧ, малярию, астму, аллергию, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания кишечника и реакцию трансплантата против хозяина (РТПХ). Таким образом, в другом воплощении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая соединение согласно изобретению, например, содержащее однодоменное антитело, как описано в настоящем документе. Как будет понятно специалисту в данной области, фармацевтическая композиция может содержать другое соединение в дополнение к соединениям, описанным в настоящем документе, например другие фармацевтически активные ингредиенты и/или вспомогательные вещества.

Также предлагается применение соединения, как описано в настоящем документе, где соединение применяют *in vitro* или где соединение применяют в методе диагностики *in vitro*, например, для детектирования экспрессии CD1d в образцах, полученных от пациента, и/или для детектирования клеток, экспрессирующих CD1d.

Согласно другому аспекту изобретения предлагается нуклеотидная последовательность, которая кодирует соединение, как описано в настоящем документе. В этом воплощении соединение согласно изобретению представляет собой полипептид, например соединение представляет собой однодоменное антитело, например, с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-21, и их вариантов консервативных последовательностей.

Последовательности, раскрытые в настоящем документе, относятся к аминокислотным последовательностям. Следовательно, специалист в данной области способен обеспечить нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, поскольку это требует только использования таблицы кодонов для преобразования аминокислотной последовательности в нуклеотидную последовательность.

Такая нуклеотидная последовательность может быть использована для ее функционального связывания с промоторной последовательностью, полиА-сигналами и т.д., с получением генетического конструктора, с которого антитело может экспрессироваться. Такая генетическая конструкция, содержащая нуклеотидную последовательность, может содержаться в клетке-хозяине. Такая клетка-хозяин или организм, отличный от человека, содержащий нуклеотидную последовательность согласно изобретению, также предусмотрены.

В предпочтительном воплощении предлагается нуклеотидная последовательность, описанная в настоящем документе и которая кодирует соединение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 - SEQ ID NO: 42 или их вариантов консервативной последовательности, и/или аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43 - SEQ ID NO: 63 или их вариантов консервативных последовательностей, и/или аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 - ID NO: 84 или их вариантов консервативных последовательностей.

Также предлагается способ получения соединения, описанного в настоящем документе, где способ включает в себя предоставление клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту согласно изобретению, возможности экспрессировать соединение; и получение соединения. Методы экспрессии и получения хорошо известны специалисту.

Наконец, также предлагается антитело, которое содержит CDR1 и/или CDR2 и/или CDR3, предпочтительно CDR1 и CDR2, еще более предпочтительно CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 - SEQ ID NO: 42 или их вариантов консервативных последовательностей, CDR2 содержит аминокислотную последова-

тельность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43 - SEQ ID NO: 63 или их вариантов консервативных последовательностей, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 - SEQ ID NO: 84 или их вариантов консервативных последовательностей. Предпочтительно области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80, 90, 95 или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью соответственно, CDR1, CDR2 и CDR3, как показано для VHH № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, как представлено в табл. 1.

Антитело может быть антителом любого типа, включая однодоменное антитело, одноцепочечное антитело, гуманизованное антитело, четырехцепочечное антитело или любую другую молекулу иммуноглобулина. Антитело может быть связано с другими функциональными или нефункциональными группами, например антитело может быть биспецифичным или мультиспецифичным антителом и/или двухвалентным или мультивалентным антителом, может содержать метку или может быть слитым, например, с наночастицей лекарственным средством, пептидом, нуклеиновой кислотой и т.д., как описано в настоящем документе выше. Антитело может быть использовано для лечения (человека) пациента, например при лечении злокачественного новообразования, или может быть использовано для связывания и детектирования человеческого CD1d и/или клеток, экспрессирующих человеческий CD1d.

Если предоставленные SEQ ID NO 22-84 в списке последовательностей отличаются от последовательностей, представленных в табл. 1, то имеет приоритет последовательность, представленная в табл. 1.

Таблица 1

Номер VHH, эталонный номер VHH, используемый в настоящем документе, и последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 различных антител CD1d по изобретению

VHH номер (SEQ ID)	VHH эталон.	CDR1 (SEQ ID 22 - 42)	CDR2 (SEQ ID 43-63)	CDR3 (SEQ ID 64-84)
1 (1)	17-1E	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERSLENMNYW

2 (2)	17-2B	GRSFSSYTMG	VIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMNYW
3 (3)	17-3D	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPIYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMRYW
4 (4)	17-4C	GRSFSSYTMG	AIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMKDW
5 (5)	17-7C	GSSFSSYTMG	GIRWSDESPIYADSVKG	RLVPPGIPIERTSESMRYW
6 (6)	17-8B	GSSFSSYTMA	AIRWSGESPIYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMRYW
7 (7)	17-9C	VSSFSSYTMG	GIRWDDENPYADSVKG	RLVPPGIPFERTLENMRYW
8 (8)	17-10B	GSSFSSYTMG	AIRWDGESPIYAESVKG	RLVPPGIPIERTLESMRYW
9 (9)	17-11B	GRSFSSYTMG	VIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMNYW
10 (10)	19-12G	GSSFSSYTMG	AIRWSDESPIYAGSVKG	RLVPPGIPIERTLESMRYW
11 (11)	17-13E	GSSFSSYTMG	AIRWSDESPIYSDSVKG	RLVPPGIPIERTLENMRYW
12 (12)	18-14B	GSMFSDNVMG	TIRTGGSTNYADSVKG	TIPVPSTPYDYW
13 (13)	19-15G	GRSFSSYTMG	AIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERTLENMNYW
14 (14)	19-22H	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMNYW
18 (15)	19-21F	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPIYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMKDW
19 (16)	19-23G	GSSFSSYTMT	GIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMRYW
20 (17)	19-24D	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPIYGDVKG	RLVPPGIPIERTLESMNNW
21 (18)	19-25F	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERALEMNYW
22 (19)	19-26A	GSSFSSYTMG	AIRWSDESPIYADSVKG	RLVPPGIPIERTLESMRYW
23 (20)	19-27F	GRSFSSYTMG	AIRWSGESPYADSVKG	RLVPPGIPIERSLENMNYW
24 (21)	18-29C	GSIFSNAMG	VISSSGSTNYADSVKG	HVAGFDEYNYW

Таблица 2

Идентичность последовательности в CDR1, CDR2 и CDR3 по сравнению с 17-1E

	CDR1	CDR2	CDR3
17-2B	90%	94%	89%
17-3D	100%	94%	84%
17-4C	90%	100%	79%
17-7C	100%	82%	73%
17-8B	90%	94%	84%
17-9C	90%	76%	84%
17-10B	100%	82%	84%
17-11B	90%	94%	89%
19-12G	100%	82%	84%
17-13E	100%	88%	84%
18-14B	60%	64%	21%
19-15G	90%	100%	95%
19-22H	100%	100%	89%
19-21F	100%	94%	79%
19-23G	90%	94%	84%
19-24D	100%	94%	79%
19-25F	100%	100%	95%
19-26A	100%	88%	84%
19-27F	90%	100%	100%
18-29C	60%	64%	15,7%

Примеры

Иммунизация.

Две индивидуальные ламы (*Lama glama*) иммунизировали, как описано (Roovers R.C. et al. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56:303-17). Вкратце, 108 стабильных CD1d-трансдуцированных C1R-клеток вводили подкожно в дни 0, 14, 28 и 35. Для создания библиотеки фагового дисплея проводили забор 150 мл крови в день 43.

Отбор CD1d-специфичного VHH.

Для конструкции библиотеки фагового дисплея из собранных 150 мл образцов крови выделяли лимфоциты периферической крови (PBL). Из выделенных лимфоцитов получали кДНК и использовали в качестве матрицы для амплификации генов, кодирующих вариабельные домены антител, содержащих только тяжелую цепь. Фрагменты ПЦР лигировали в фагмидный вектор pUR8100 и трансформировали в клетки *E.coli*. Таким образом получали две библиотеки VHH, которые впоследствии экспрессировали на фагах и использовали для отбора. С этой целью фаги из обеих библиотек инкубировали в течение 2 ч при 4°C с CD1d-трансфицированными клетками HeLa. Затем клетки промывали и связанные фаги элюировали с помощью 100 мМ HCl в течение 7 мин при 4°C. Удаленные фаги затем нейтрализовали с помощью трис-HCl с последующей инфекцией *E.coli*. Отобранные фаги затем последовательно отбирали дважды в течение 1 ч при 4°C с использованием C1R-клеток дикого типа, после чего несвязанные фаги инкубировали в течение 1 ч с CD1d-трансфицированными C1R-клетками. Связанные фаги затем элюировали и инфицировали *E.coli*, как описано выше. Бактерии высевали на чашки с агаром, содержащим 2% глюкозы/ампициллина, для образования единичных бактериальных колоний, кодирующих ДНК VHH. ДНК VHH из индивидуальных клонов гидролизуют ферментами рестрикции SfiI/BstEII и клонировали в плазмиду pMEK219, производную от pHen1 (Hoogenboom HR, et al. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:4133-4137), с добавлением кассеты HC-V для возможности клонирования по SfiI/BstEII и с делецией C-концевого тус- и 6x-HIS-маркера последовательности genIII. pMEK219-VHH трансформировали в бактерии TGI *E.coli*.

Ночную культуру использовали для инокуляции среды 2xTY, содержащей 0,1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Когда OD₆₀₀ достигало 0,5, добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Продуцирование белка обеспечивали в течение 2-5 ч. Рост всех культур осуществляли при 37°C при энергичном встряхивании при 200-220 об/мин. Продуцирование белка прекращали путем центрифугирования культур в течение 15 мин при 4°C. Бактериальный осадок ресуспендировали в PBS и замораживали в течение по меньшей мере 1 ч при -80°C. Бактериальную суспензию оттаивали, слегка встряхивали в течение 1 ч при 4°C и центрифугировали при 4500 об/мин в течение 30 мин. Супернатант использовали для подтверждения связывания с CD1d-трансфицированными C1R-клетками с использованием проточной цитометрии.

Специфичность CD1d отобранного VHH.

Подтверждение специфичного связывания CD1d оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием клеток C1R и K562, экспрессирующих CD1a, CD1b, CD1c или CD1d. Окрашивание проводили на 96-луночном планшете и все инкубации осуществляли в буфере FACS в течение 30 мин при 4°C. Для первичных скринингов связывания с CD1d клетки инкубировали с 25 мкл супернатанта, содержащего анти-CD1d VHH. После промывки клетки инкубировали с клоном 4A6 антитела против тус, содержащего tag-маркер (Merck Millipore, MA, USA), с конечным разведением 1:500, промывали и инкубировали с козьим антителом к мышиному F(ab)₂ APC (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), конечное разведение 1:200. После заключительной стадии промывки связывание VHH с клетками оценивали с помощью проточной цитометрии (FACS Fortessa, BD Biosciences). Отбирали VHH, демонстрирующие специфичное связывание. В качестве положительного контроля использовали анти-CD1d 51.1 mAb (eBiosciences Inc, Нью-Джерси, США), в качестве отрицательного контроля использовали нанотело, специфичное для азокрасителя RR6. Связывание отобранного анти-CD1d VHH с CD1d подтверждали после очистки (см. ниже) и секвенирования анти-CD1d VHH. Для этих экспериментов анти-CD1d VHH и контрольные образцы тестировали при концентрации 5 мкг/мл. Репрезентативные данные представлены на фиг. 1.

Фингерпринт-анализ и секвенирование.

Для отбора структурно отличающихся CD1d-специфичных VHH, ДНК отобранных VHH амплифицировали с помощью ПЦР колонии, расщепляли HinfI и затем прогоняли на 2% агарозном геле. На основе профиля гидролиза могут быть выбраны разные семейства. Затем индивидуальные семейства секвенировали (BaseClear BV Leiden, Нидерланды) для подтверждения уникальности клонов.

Продуцирование и очистка VHH.

Супернатанты, содержащие уникальный анти-CD1d VHH, получали, как описано ранее. Для очистки эти супернатанты затем инкубировали с промытой смолой Talon (Clontech, Маунтин-вью, Калифорния, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Смолу Talon промывали три раза PBS и один раз с помощью 15 мМ имидазола/PBS pH 7 и элюировали 150 мМ имидазолом/PBS pH 7. Элюированную фракцию дважды диализовали в течение 24 ч против PBS. Концентрацию очищенного VHH определяли

путем измерения Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Вилмингтон, Делавер, США) и чистоту подтверждали с помощью окрашивания кумасси геля с белками.

Анти-CD1d-опосредованное созревание moDC.

Дендритные клетки, полученные из незрелых моноцитов (moDC), были получены, как описано (Lameris R. et al., *Methods Mol. Biol.*, 2014; 1139:155-65). MoDC культивировали в полной среде (RPMI-1640, содержащей HEPES, 10% FCS, 0,05 mM бета-меркаптоэтанол, (β -ME), 100 ME/мл натриевой соли пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 2 mM 1-глутамин) в 48-луночных планшетах с концентрацией 6×10^4 клеток /на лунку в присутствии 5 нг/мл rhIL-4, 500 ед/мл rhGM-CSF, 1000 мкг/мл rhINF- γ , 25 мкг/мл Полимиксина В и 500 нМ анти-CD1d VHH или отрицательного контроля VHH. LPS (200 нг/мл) использовали в качестве положительного контроля. Через 24 ч супернатанты брали для анализа продуцирования IL-12 и IL-10 (не показано) (с использованием ИФА). Через 72 ч клетки собирали и анализировали на экспрессию маркеров созревания moDC (PE-меченое анти-CD86 (не показано), APC-меченое анти-CD83, BD Biosciences) с использованием проточной цитометрии (FACS Fortessa, BD Biosciences). Репрезентативные данные представлены на фиг. 2.

Ингибирование α GalCer-индуцированной активации iNKT с помощью анти-CD1d VHH.

iNKT-клетки генерировали, как описано в публикации (Lameris R. et al., *Methods Mol. Biol.* 2014, 1139:155-65). 5×10^4 CD1d-трансфицированных клеток HeLa культивировали в течение ночи при 37°C в 96-луночном планшете в среде DMEM, содержащей 10% FCS, 0,05 mM β -ME, 100 ME/мл натриевой соли пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 2 mM 1-глутамин и 400 нг/мл α -GalCer. Затем клетки HeLa-CD1d промывали и инкубировали с 500 нМ анти-CD1d VHH (или отрицательным контролем VHH) в течение 2 ч при 37°C, после чего добавляли 5×10^4 оставшихся (<25% экспрессии CD25) iNKT. Через 24 ч супернатанты собирали для детектирования IFN- γ и IL-4 (с использованием ИФА), в то время как iNKT-клетки собирали, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии для детектирования индукции (или ингибирования) активации iNKT-клеток (оценивали с помощью экспрессии маркера активации CD25 на iNKT-клетках (FACS Fortessa, BD Biosciences). См. фиг. 3 и 7 для репрезентативных результатов по меньшей мере с VHH24.

Индукция активации iNKT-клеток с помощью анти-CD1d VHH.

iNKT-клетки генерировали, как описано в публикации (Lameris R. et al., *Methods Mol. Biol.* 2014, 1139:155-65). 5×10^4 CD1d-трансфицированные клетки HeLa, CD1d-трансфицированные клетки C1R и CD1d-трансфицированные клетки MM.1s культивировали в течение ночи при 37°C в 96-луночном планшете в среде DMEM, содержащей 10% FCS, 0,05 mM β -ME, 100 ME/мл натриевой соли пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 2 mM 1-глутамин в присутствии или в отсутствие α -GalCer 100 нг/мл или контроля носителя. CD1d-трансфицированные клетки, загруженные вместе с α -GalCer или контролем носителя, затем промывали и инкубировали с 500 нМ анти-CD1d VHH (или отрицательным контролем VHH) в течение 2 ч при 37°C, после чего добавляли 5×10^4 оставшихся (<25% экспрессию) iNKT-клеток. Через 24 ч супернатанты собирали для детектирования IFN- γ и IL-4 (с использованием ИФА), в то время как iNKT-клетки собирали, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки индукции активации iNKT-клеток (оценивали с помощью экспрессии маркера активации CD25 на клетках iNKT (FA CS Fortessa, BD Biosciences). См. фиг. 4 и 8 (зависимость от концентрации) для репрезентативных результатов; данные показаны для VHH12.

Анализ связывания аннексина V, индуцированного с помощью анти-CD1d VHH.

CD1d-C1R и CD1d-MM.1s (а также нетрансфицированные клеточные линии C1R и MM.1s в качестве отрицательных контролей) культивировали при 37°C в 48-луночном планшете с количеством 1×10^5 клеток на лунку и инкубировали с 500 нМ анти-CD1d VHH, отрицательным контролем VHH или анти-CD1d 51.1 mAb (в качестве положительного контроля). Через 24 ч клетки окрашивали с аннексином V и йодидом пропидия (PI) в соответствии с протоколом производителя (VPS Diagnostics, Хогевен, Нидерланды) и анализировали с помощью проточной цитометрии (FACS Fortessa, BD Biosciences). Экспериментальные результаты представлены на фиг. 5.

Индукция активации iNKT-клеток с помощью связанных с планшетом CD1d и анти-CD1d VHH.

iNKT-клетки генерировали, как описано в публикации (Lameris R. et al., *Methods Mol. Biol.* 2014, 1139:155-65). α -GalCer (1 mM) или контроль носителя (100% ДМСО) нагревали в течение 2 мин при 80°C, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин и затем разбавляли стерильным теплым (37°C) 0,1% тритоном-X до концентрации 100 мкМ. Затем добавляли 6 мкМ биспецифичного конструктора, состоящего из анти-EGFR VHH, слитого с β 2m-человеческий CD1d, в соотношении 1:1. Конечные концентрации α -GalCer и β 2m-CD1d-анти-EGFR-конструктора составляли 50 и 3 мкМ соответственно. Носитель и α -GalCer инкубировали в течение ночи при комнатной температуре при встряхивании. На 96-луночные планшеты наносили покрытие в виде анти-flag mAb (Sigma, клон M2, 1:1000) и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день покрытые анти-flag планшеты промывали трижды PBS и инкубировали с α -GalCer или с носителем, нагруженным конструктором, разбавленным в PBS (концентрация конст-

рукта 0,5 мкМ) в течение 2 ч при встряхивании при комнатной температуре. После промывки с помощью PBS покрытые планшеты инкубировали с 250 нМ анти-CD1d VHH в течение 2 ч при 37°C, после чего добавляли 1×10^5 (<25% CD25 экспрессии) iNKT-клеток. Через 24 ч iNKT-клетки собирали, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки индукции активации iNKT-клеток (оценивали с помощью экспрессии маркера активации CD25 на клетках iNKT (FACS Fortessa, BD Biosciences). Результаты представлены на фиг. 6.

VHH12.

В дополнение к данным, представленным выше, проводили дополнительные эксперименты с использованием VHH12. Результаты экспериментов представлены на фиг. 9-11.

На фиг. 9 изображены индукция дегрануляции клеток iNKT (слева) и цитотоксичность против CD1d⁺ опухолевой клеточной линии (справа)

На фиг. 10 изображена индукция цитотоксичности клеток iNKT против CD1d⁺ клеток первичной множественной миеломы.

На фиг. 11 изображена индукция продуцирования цитокинов iNKT-клетками с помощью анти-CD1d VHH12.

Для детектирования продуцирования цитокинов клетки HeLa-CD1d стимулировали с контролем носителя, OCH (сфингозин-усеченное производное альфа-галактозилцерамида (альфа-GC), гликолипид, как сообщалось, индуцирует продуцирование Th2-цитокинов в клетках iNKT) или αGC, инкубировали с анти-CD1d VHH и контролями и совместно культивировали с iNKT в течение 24 ч, после чего супернатанты анализировали (с помощью анализа Cytometric Bead Assay, CBA). N=4, *p<0,05, ****p<0,0001. Показанный анти-CD1d VHH представляет собой VHH12.

Результаты.

Типичные результаты различных экспериментов представлены на фигурах и в сопровождающих их подписях; дополнительные экспериментальные данные обсуждаются выше в контексте настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 75 соответственно.

2. Однодоменное антитело по п.1, где однодоменное антитело содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.

3. Однодоменное антитело по любому из предыдущих пунктов, где однодоменное антитело связывается с человеческим CD1d, но не с человеческим CD1a, человеческим CD1b и/или человеческим CD1c.

4. Однодоменное антитело по любому из предыдущих пунктов, где однодоменное антитело способно индуцировать активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, включая инвариантные натуральные киллерные Т-клетки, и/или стимулировать индуцированную гликолипидом, например альфа-галактозилцерамидом, активацию CD1d-рестриктированных Т-клеток, включая инвариантные натуральные киллерные Т-клетки.

5. Однодоменное антитело по любому из предыдущих пунктов, где однодоменное антитело представляет собой гуманизованное однодоменное антитело.

6. Биспецифичное антитело, содержащее однодоменное антитело по любому из предыдущих пунктов.

7. Мультиспецифичное антитело, содержащее однодоменное антитело по любому из предыдущих пунктов.

8. Применение однодоменного антитела, биспецифичного антитела или мультиспецифичного антитела по любому из предыдущих пунктов для лечения злокачественного новообразования.

9. Применение однодоменного антитела, биспецифичного антитела или мультиспецифичного антитела по любому из пп.1-7 в качестве диагностического агента *in vivo*.

10. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования, содержащая однодоменное антитело, биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело по любому из пп.1-7.

11. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует однодоменное антитело по любому из пп.1-5.

12. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует биспецифичное антитело по п.6.

13. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует мультиспецифичное антитело по п.7.

14. Клетка-хозяин для получения однодоменного антитела по любому из пп.1-5, содержащая нуклеотидную последовательность по п.11.

15. Клетка-хозяин для получения биспецифичного антитела по п.6, содержащая нуклеотидную последовательность по п.12.

16. Клетка-хозяин для получения мультиспецифичного антитела по п.7, содержащая нуклеотидную

последовательность по п.13.

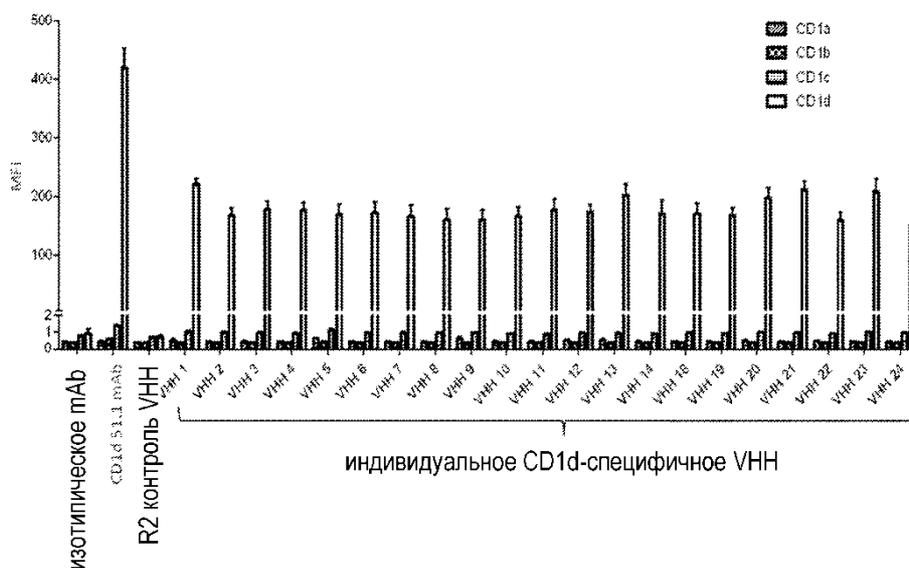
17. Способ получения однодоменного антитела по любому из пп.1-5, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.14 с экспрессией указанного однодоменного антитела.

18. Способ получения биспецифичного антитела по п.6, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.15 с экспрессией указанного биспецифичного антитела.

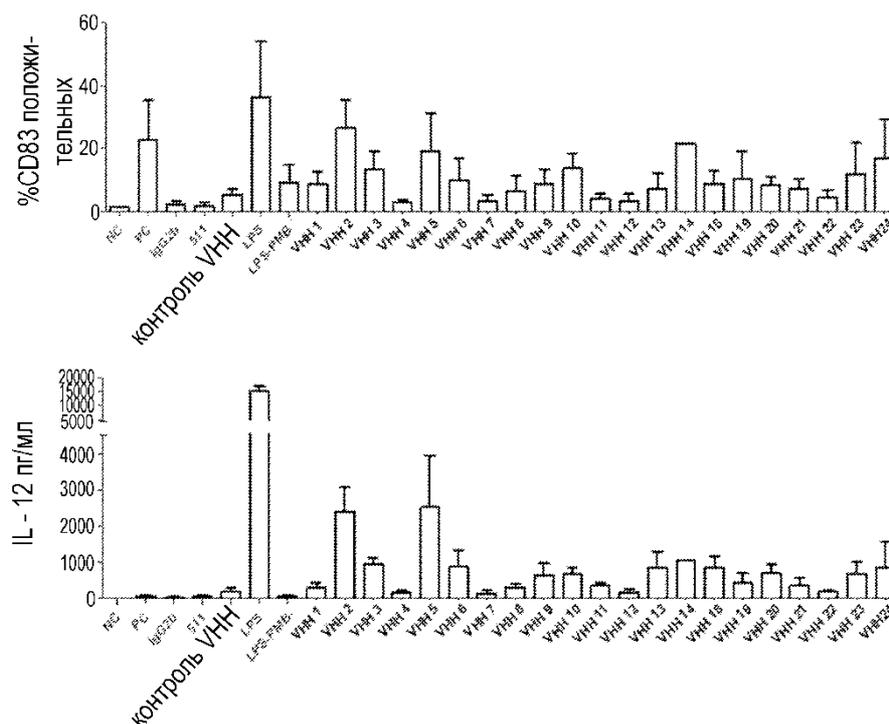
19. Способ получения мультиспецифичного антитела по п.7, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.16 с экспрессией указанного мультиспецифичного антитела.

20. Соединение, содержащее однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, и метку, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 75.

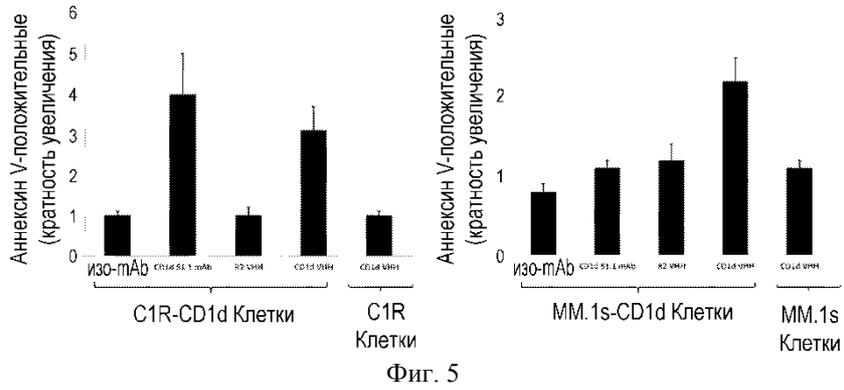
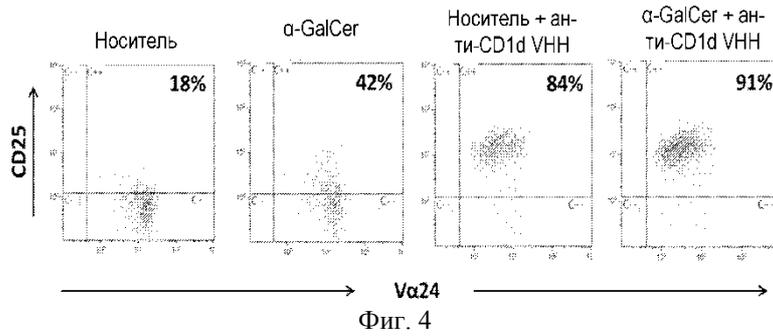
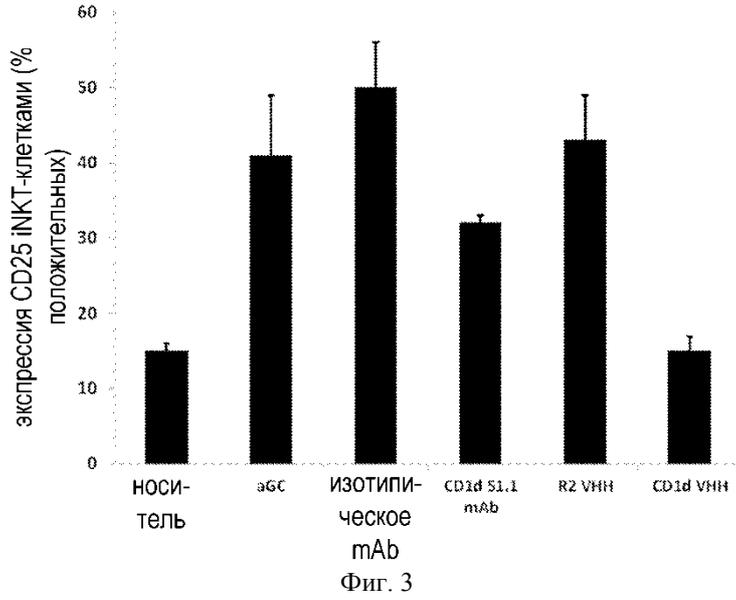
21. Соединение, содержащее однодоменное антитело, которое связывается с человеческим CD1d, связанное с фармацевтическим активным агентом, где однодоменное антитело содержит области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 75 соответственно.

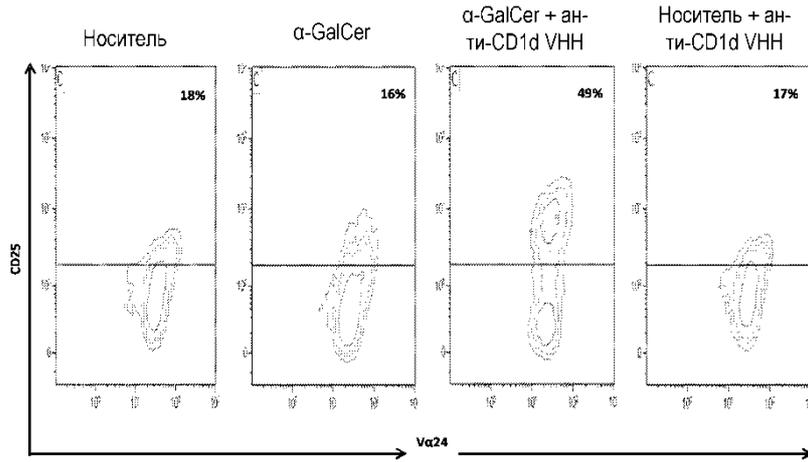


Фиг. 1

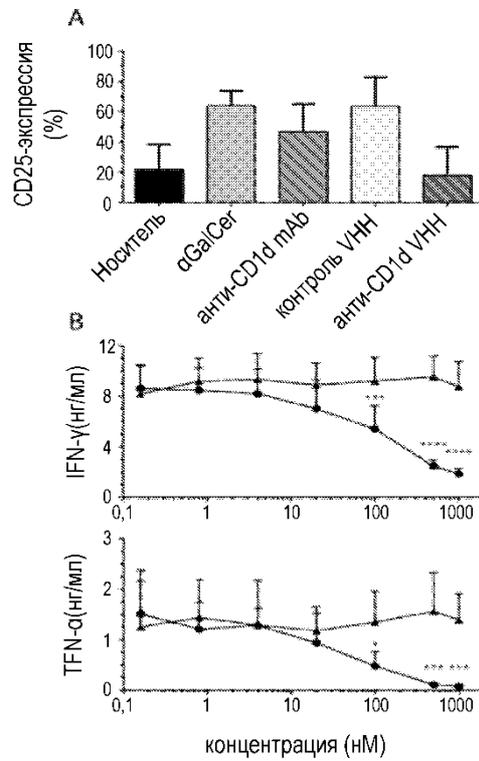


Фиг. 2

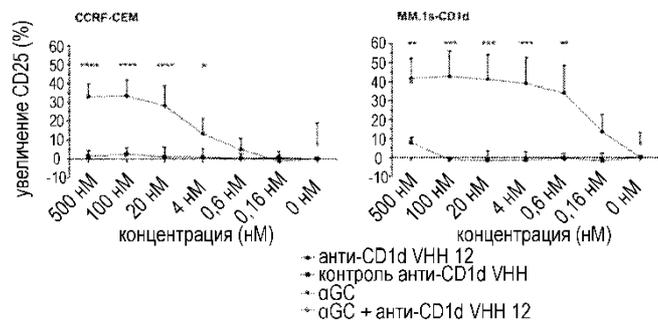




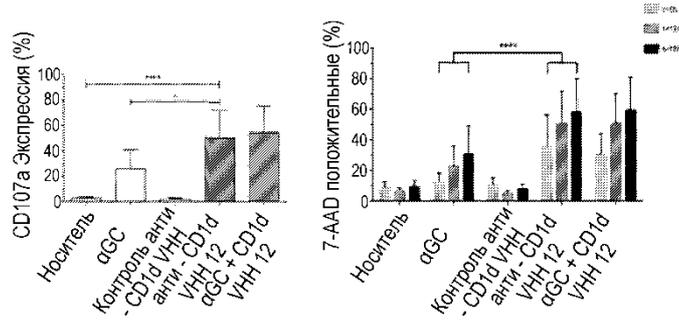
Фиг. 6



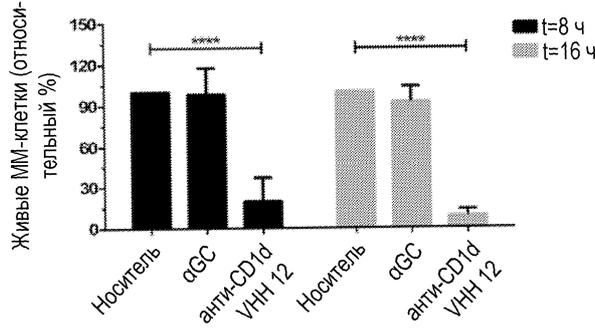
Фиг. 7



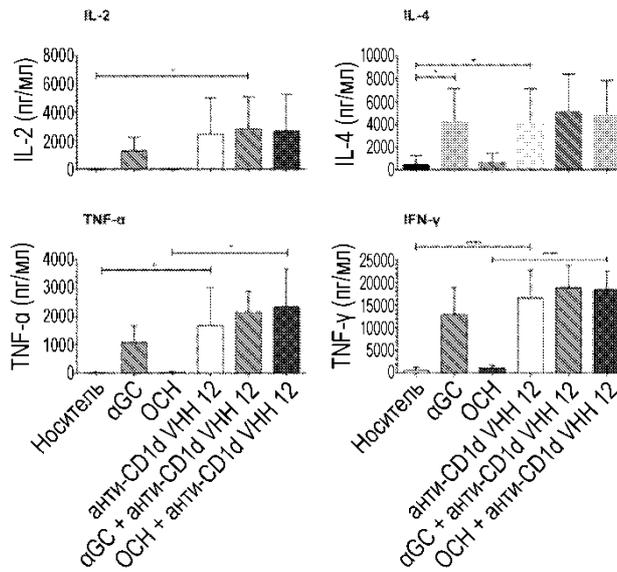
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

