

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034676

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.05
- (21) Номер заявки
201691212
- (22) Дата подачи заявки
2015.01.09

- (51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НОВОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕТРИНА-1

- (31) 14305034.2
(32) 2014.01.10
(33) EP
(43) 2016.12.30
(86) PCT/EP2015/050306
(87) WO 2015/104360 2015.07.16
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЕТРИС ФАРМА (FR)
- (72) Изобретатель:
Делькро Жан-Ги, Деан Ян (FR)
- (74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)
- (56) FR-A1-2878165
WO-A1-2010079230
WO-A1-2007099133
FITAMANT JULIEN ET AL.: "Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol.

105, no. 12, 25 March 2008 (2008-03-25), pages 4850-4855, XP002537856, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0709810105, page 4851, right-hand column, last paragraph - page 4854, left-hand column, paragraph 2, page 4854, right-hand column, last paragraph

BRAISTED J. E. ET AL.: "Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, vol. 20, no. 15, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 5792-5801, XP002591612, ISSN: 0270-6474, page 5793, right-hand column, paragraph 4

DELLOYE-BOURGEOIS ET AL.: "Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer.", JNCI, vol. 101, no. 4, 18 February 2009 (2009-02-18), pages 237-247, XP002537859, ISSN: 1460-2105, DOI: 10.1093/JNCI/DJN491, cited in the application, paragraph [results], page 246, right-hand column, last paragraph

WO-A2-2014041088
WO-A1-2014041078

- (57) В изобретении предложен антигенный полипептид, содержащий линейный эпитоп нетрина-1. Данный полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3, или представляет собой фрагмент последовательности SEQ ID NO: 3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 35, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или же кодируется кДНК, имеющей последовательность SEQ ID NO: 4 или её вариант, обусловленный выраженной генетическим кода, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4. Указанный антигенный полипептид способен вызвать образование антитела, которое специфически связывается с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35. В связи с этим настоящее изобретение также относится к применению антигенного полипептида для получения антител, связывающихся с нетрином-1, и к полученным таким образом антителам, которые способны индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или рецепторы DCC. В изобретении также предлагается фармацевтическая композиция для лечения рака, где раковые клетки или клетки стromы экспрессируют нетрин-1, включающая антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

B1

034676

034676
B1

Настоящее изобретение имеет отношение к связывающим нетрин-1 полипептидам или антителам, которые применимы в отношении индукции гибели клеток или апоптоза опухолевых клеток, несущих рецепторы нетрина-1 типа рецептора UNC5, в присутствии нетрина-1, в частности опухолей, экспрессирующих нетрин-1, и к их применению для лечения рака.

Нетрин-1 является представителем семейства нетринов и служит ориентиром для продвижения аксонов, как в плане привлечения, так и в плане отталкивания, и играет важную роль в развитии нервной системы. Основные рецепторы для нетрина-1 - DCC (элиминируется при колоректальном раке) и UNC5 (UNC5A, UNC5B, UNC5C, UNC5D у человека, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, UNC5H4 у мышей), которые все принадлежат к семейству зависимых рецепторов (dependence receptors) (Keino-Masu, 1996, Cell 87: 175-185; Ackermann, 1997, Nature 386: 838-842; Hong, 1999, Cell 97: 927-941; Mehlen, 1998, Nature 395: 801-804). Зависимые рецепторы обладают способностью индуцировать апоптоз при отсутствии соответствующих лигандов, причем эта способность блокируется при связывании соответствующего лиганда (Mehlen, 2004, Cell Mol Life Sci 61: 1854-1866; Bredesen, 2005, Cell Death Differ 12: 1031-1043).

При различных раковых заболеваниях у человека наблюдается снижение или потеря экспрессии DCC и тем самым снижение или потеря индуцируемого DCC апоптоза (Kinzel, 1996, Proc Natl Acad Sci 100: 4173-4178). Кроме того, оказалась, что у большинства колоректальных опухолей также подавляются гены UNC5, указывая на то, что потеря зависимых рецепторов UNC5 представляет селективное преимущество для опухолевых клеток (Bernet, 2007, Gastroenterology 133: 180-1848; Shin, 2007, Gastroenterology 133: 1849-1857). Однако не только понижающая регуляция зависимых рецепторов DCC и UNC5 повышает выживаемость различных опухолевых клеток, но наблюдается и аутокринная экспрессия их лиганда нетрина-1. В частности, показано, что большинство опухолей молочной железы, то есть метастатические опухоли рака молочной железы, проявляют повышение экспрессии нетрина-1 (Fitamant, 2008, Proc Natl Acad Sci 105: 4850-4855). Уже показано, что за связывание нетрина-1 отвечают два иммуноглобулиновых (Ig) субдомена внеклеточной части UNC5, но пока еще не ясно, нужны ли оба домена для полного связывания нетрина-1 (Geisbrecht, 2003, J. Biol. Chem. 278: 32561-32568; Kruger, 2004, J. Neur. 24: 10826-10834).

Как было показано ранее, нейтрализация нетрина-1 эктодоменом DCC или частью этого эктодомена (действуя в качестве белка-приманки для нетрина-1) может индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, экспрессирующих зависимые рецепторы DCC и/или UNC5 (EP-A1-1989546). Этот эктодомен или часть этого эктодомена способен снижать метастазирование раковых клеток молочной железы в легких (Fitamant et al., 2008). Кроме того, также было показано, что этот эктодомен или часть этого эктодомена повышает степень гибели клеток при немелкоклеточном раке легких и клеток нейробластомы, экспрессирующих высокие уровни нетрина-1 (Delloye-Bourgeois, 2009, J Natl Cancer Inst 101: 237-247; Delloye-Bourgeois, 2009, JEM 206: 833-847). В WO 2012/025618 раскрыты слитые с DCC белки с улучшенными свойствами приманки для DCC.

В EP 1989546 (WO 2007/099133) раскрыты моноклональные или поликлональные антитела, направленные конкретно против нетрина-1 или рецепторов нетрина-1, в частности против внеклеточного домена рецепторов нетрина-1 или против фрагмента нетрина-1, способного взаимодействовать с внеклеточным доменом данных рецепторов нетрина-1, в качестве лекарственного средства.

Заявитель сейчас определил линейный или практически линейный эпитоп у нетрина-1, который, вероятно, соответствует участку специфического связывания нетрина-1 с рецепторами, в частности, из класса UNC5, в особенности UNC5B и UNC5A, или же соответствует участку, близкому к участку специфического связывания нетрина-1 с рецептором, который при связывании с антителом предотвращает взаимодействие нетрина-1 с рецептором. Это выявление линейного эпитопа позволяет заявителю получать антитела, связывающиеся с нетрином-1 и предотвращающие взаимодействие нетрина-1 с рецепторами, тем самым индуцируя апоптоз или клеточную гибель опухолевых клеток, экспрессирующих или гиперэкспрессирующих нетрин-1 и по меньшей мере один из рецепторов нетрина-1, благодаря тому, что это взаимодействие ингибитирует связывание нетрина-1 с рецептором и мультимеризацию рецептора. Заявитель также получил моноклональное антитело мыши, направленное против этого эпитопа, и его различные гуманизированные формы.

Полноразмерная аминокислотная последовательность нетрина-1 приведена в виде SEQ ID NO: 1, а последовательность кодирующей его кДНК приведена в виде SEQ ID NO: 2. Линейный эпитоп охарактеризован во втором EGF-подобном домене нетрина-1 и отображен в SEQ ID NO: 3, более конкретно в SEQ ID NO: 35. Кодирующая этот эпитоп к ДНК представлена в SEQ ID NO: 4 и соответственно 36.

Итак, первым объектом изобретения является выделенный или очищенный антигенный полипептид нетрина-1, который

имеет последовательность SEQ ID NO: 3, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3, или представляет собой фрагмент последовательности SEQ ID NO: 3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 35, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35; или

кодируется кДНК имеющей последовательность SEQ ID NO: 4 или её вариант, обусловленный вырожденностью генетического кода, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична

SEQ ID NO: 4.

Указанный антигенный полипептид способен вызвать образование антитела, которое специфически связывается с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35.

Другим объектом изобретения является кДНК, кодирующая антигенный полипептид нетрина-1, имеющая последовательность SEQ ID NO: 4 или 36, или её вариант, обусловленный вырожденностью генетического кода, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4 или 36.

Другим объектом изобретения является применение вышеописанного антигенного полипептида для получения моноклонального антитела, которое способно специфически связываться с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35. Специалистам в этой области известны методы, позволяющие получать моноклональные антитела, используя плазмоциты и гибридомные методы. Изобретение охватывает применение этих методов для получения антител, специфически направленных против полипептида SEQ ID NO: 3 или 35 либо их вариантов. Кроме того, в объем притязаний данного изобретения также входит получение полипептидов или моноклональных антител методами генной инженерии на основе последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих определенный полипептид или антитело, благодаря определению и раскрытию участков CDR в V_H и V_L. Кроме того, в объем притязаний данного изобретения входит получение фрагментов антител и/или гуманизированных антител либо фрагментов антител с вариабельной областью, специфичной к линейному эпитопу по изобретению, его фрагменту или варианту.

Таким образом, настоящее изобретение также касается моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающихся с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35, или в последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3, причем указанное антитело способно индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или рецепторы DCC.

Настоящее изобретение также касается моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающихся с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35, которые содержат CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7, а также CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9, причем антитело способно индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или рецепторы DCC.

В еще одном аспекте настоящее изобретение касается моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающихся с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35, которые содержит CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30, а также CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9, причем антитело способно индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или рецепторы DCC.

Данное антитело может содержать вариабельный участок тяжелой цепи имеющий последовательность SEQ ID NO: 10 и вариабельный участок легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1.

Более конкретно, антитело может содержать тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 12 и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 13.

Объектом изобретения также является антитело, которое содержит вариабельный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 14-19, и вариабельный участок легкой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 20-27.

Другим объектом изобретения является фармацевтическая композиция для лечения рака, где раковые клетки или клетки стромы экспрессируют нетрин-1, включающая антитело изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

Следующим объектом изобретения является применение антитела изобретения для изготовления фармацевтической композиции, предназначеннной для лечения рака, где опухолевые клетки или клетки стромы экспрессируют нетрин-1.

Рак представлен таким, при котором опухолевые клетки экспрессируют или гиперэкспрессируют нетрин-1. Как правило, опухолевые клетки избегают связанного с рецептором нетрина-1 апоптоза при связывании нетрина-1 с данным рецептором, в частности, из класса UNC5, в особенности UNC5B и/или UNC5A, и/или DCC, в присутствии нетрина-1. Некоторые воплощения раковых заболеваний включают метастатический рак молочной железы, немелкоклеточный рак легких, агрессивную нейробластому, аденокарциному поджелудочной железы, первичную меланому, метастазирующую меланому, рак яичников, глиобластому, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, агрессивную В-клеточную лимфому, саркому, почечную аденокарциному, рак головы и шеи, рак яичек (например, эмбриональную карциному, тератому, опухоли мошонки), рак почек, рак желудка, рак матки.

Способы определения того, что данные клетки проявляют значительное усиление экспрессии генов нетрина-1, хорошо известны в данной области и включают, без ограничения, методы ИИС (иммуногисто-

химии), FACS (активируемой флуоресценцией сортировки клеток), количественной ПЦР (например, с праймингом кДНК гексамерами) или же Вестерн-блота вкупе с детектированием белка на основе хромогенных красителей (типа окрашивания серебром или Кумасси синим) либо методы детектирования белков в растворах и гелях, блотах и микрочипах на основе флуоресценции и люминесценции типа иммуноокрашивания, а также методы иммунопреципитации, ELISA, микроматриц и масс-спектрометрии. В контексте настоящего изобретения, здесь представлены примеры подлежащих лечению раковых заболеваний, в том числе рефрактерные варианты любого из указанных раковых заболеваний. При этом гиперэкспрессия нетрин-1 может быть измерена методом ОТ-ПЦР с использованием подходящих праймеров типа тех, что раскрыты и представлены здесь, по отношению к нормальной ткани или близкому типу рака, при котором не гиперэкспрессируется нетрин-1.

Определения и другие воплощения, варианты и альтернативы изобретения

В настоящем изобретении последовательность, которая "по меньшей мере на 85% идентична эталонной последовательности", означает такую последовательность, которая по всей своей длине на 85% или более, в частности на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична эталонной последовательности по всей её длине.

Степень "идентичности последовательностей" может быть определена путем сравнения двух последовательностей, оптимально выравненных в окне сравнения, причем часть полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать вставки или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит вставок или делеций) для оптимального выравнения этих двух последовательностей. Степень рассчитывается путем определения числа положений, в которых располагаются идентичные аминокислотные остатки в обеих последовательностях, получая число совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100, получая степень идентичности последовательностей в процентах. Оптимальное выравнение последовательностей для сравнения проводится путем глобального попарного выравнивания, например, с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443. Процент идентичности последовательностей можно легко определить, к примеру, с помощью программы Needle, с матрицей BLOSUM62 и следующими параметрами: gap-open=10, gap-extend=0,5.

В контексте настоящего изобретения "консервативная замена аминокислоты" означает, что аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим группу в боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем случае консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серина и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и 7) содержащие серу боковые цепи: цистеин и метионин. Консервативные группы аминокислотных замен: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин-триптофан, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

По всей настоящей заявке термин "содержащий" следует интерпретировать как охватывающий все приведенные конкретно признаки, а также необязательные, дополнительные, неопределенные признаки. В настоящем изобретении термин "содержащий" также обозначает воплощения, в которых не присутствуют никакие другие признаки, кроме конкретно упомянутых (т.е. "состоящий из").

"Антитело" может представлять собой природное или обычное антитело, у которого две тяжелые цепи соединяются друг с другом дисульфидными связями, а также каждая тяжелая цепь соединяется с легкой цепью дисульфидной связью. Есть два типа легких цепей: лямбда (λ) и каппа (κ). Есть пять основных классов тяжелых цепей (или изотипов), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит домены с различной последовательностью. Легкая цепь включает в себя два домена или области: вариабельный домен (V_L) и константный домен (C_L). Тяжелая цепь включает в себя четыре домена: вариабельный домен (V_H) и три константных области (C_H1 , C_H2 и C_H3 , имеющие общее название C_H).

Вариабельные области и легких (V_L), и тяжелых (V_H) цепей определяют распознавание и специфичность связывания с антигеном. Домены константной области легких (C_L) и тяжелых (C_H) цепей придают такие важные биологические свойства, как ассоциация цепей антитела, секреция, трансплacentарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из вариабельных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антител заключается в структурной комплементарности между связывающим сайтом антитела и антигенной детерминантой. Связывающие сайты антител состоят из таких остатков, которые в основном происходят из гипервариабельных или определяющих комплементарность участков (CDR). Иногда на общую структуру домена и тем самым на связывающие сайты влияют остатки из негипервариабельных или каркасных участков (FR).

"Определяющие комплементарность участки" или "CDR" относятся к таким аминокислотным по-

следовательностям, которые вместе определяют сродство и специфичность связывания у природной Fv-области нативного сайта связывания иммуноглобулина. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина содержит три участка CDR, которые обозначаются CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, соответственно. Таким образом, обычный антиген-связывающий сайт антитела включает в себя шесть CDRs, составляющих комплект CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

"Каркасные участки" (FR) относятся к таким аминокислотным последовательностям, которые располагаются между CDRs, т.е. к таким частям вариабельных областей легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, которые относительно консервативны среди различных иммуноглобулинов у данного вида. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина содержит четыре FR-участка, которые обозначаются FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H соответственно.

В настоящем изобретении "человеческий каркасный участок" означает такой каркасный участок, который существенно идентичен (примерно на 85% или более, в частности на 90, 95, 97, 99 или 100%) каркасному участку встречающегося в природе антитела человека.

В контексте настоящего изобретения определение CDR/FR в легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина следует проводить на основе определения IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol. 27(1):55-77; www.imgt.org).

В настоящем изобретении термин "антитело" обозначает обычные антитела и их фрагменты, а также однодоменные антитела и их фрагменты, в частности, вариабельные области тяжелой цепи однодоменных антител, а также химерные, гуманизованные, биспецифичные или мультиспецифичные антитела.

В настоящем изобретении термин антитело или иммуноглобулин также включает и "однодоменные антитела", которые были недавно описаны и которые представляют собой антитела, в которых гипервариабельные области являются частью однодоменного полипептида. Примеры однодоменных антител включают в себя тяжелоцепочечные антитела, антитела, по природе лишенные легких цепей, однодоменные антитела, происходящие из обычных четырехцепочечных антител, сконструированные однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут происходить из любого вида, в том числе, но без ограничения, из мыши, человека, верблюда, ламы, козы, кролика и крупного рогатого скота. Однодоменные антитела могут представлять собой встречающиеся в природе однодоменные антитела, известные как тяжелоцепочечные антитела, лишенные легких цепей. В частности, различные Camelidae, к примеру, верблюды, одногорбые верблюды, ламы, альпаки и гуанако, вырабатывают тяжелоцепочечные антитела, по природе лишенные легких цепей. У верблюжьих тяжелоцепочечных антител также отсутствует домен С_H.

Вариабельные области тяжелых цепей этих однодоменных антител, лишенных легких цепей, известны как "V_{HH}" или "нанотела". Как и обычные домены V_H, домены V_{HH} содержат четыре FRs и три CDRs. Нанотела имеют преимущества перед обычными антителами: они примерно в десять раз меньше, чем молекулы IgG, поэтому могут быть получены правильно уложенные функциональные нанотела путем экспрессии *in vitro* с высоким выходом. Кроме того, нанотела очень стабильны и устойчивы к действию протеаз. Свойства и получение нанотел рассмотрены в Harmsen and De Haard (Harmsen and De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:13-22).

Термин "моноклональное антитело" или "mAb" в настоящем изобретении относится к молекулам антитела одинакового аминокислотного состава, которое направлено против определенного антигена, и не должен восприниматься как требующий получения антитела каким-то конкретным способом. Моноклональные антитела могут вырабатываться одним клоном В-клеток или гибридомой, но они также могут быть рекомбинантными, т.е. полученными путем белковой инженерии.

"Фрагменты" (обычных) антител содержат часть интактного антитела, в частности, участок связывания антигена или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диатела, биспецифичные и мультиспецифичные антитела, полученные из фрагментов антител. Фрагментом обычного антитела также может быть однодоменное антитело типа тяжелоцепочечных антител или V_{HH}.

Термин "Fab" обозначает фрагмент антитела с молекулярной массой около 50 000 Да и обладающий антиген-связывающей активностью, в котором примерно половина N-концевой части H-цепи и вся L цепь, среди фрагментов, полученных при обработке IgG протеазой - папаином, связаны друг с другом через дисульфидную связь.

Термин "F(ab')₂" обозначает фрагмент антитела с молекулярной массой около 100 000 Да и обладающий антиген-связывающей активностью, который немного больше, чем Fab, связанный через дисульфидную связь у шарнирной области, среди фрагментов, полученных при обработке IgG протеазой - пепсином.

Одноцепочечный Fv-полипептид ("scFv") представляет собой ковалентно связанный гетеродимер V_H::V_L, который обычно экспрессируется при слиянии генов, включающем гены, кодирующие V_H и V_L, соединенные кодирующими пептид линкером. ScFv-фрагмент человека по изобретению включает CDRs, которые поддерживаются в соответствующей конформации, в частности, с применением методов рекомбинации генов. Двухвалентные и поливалентные фрагменты антител могут образовываться либо спонтанно, путем объединения одновалентных scFvs, или же могут быть получены путем соединения однова-

лентных scFvs пептидным линкером, как-то двухвалентные sc(Fv)₂.

"dsFv" представляет собой гетеродимер $V_H:V_L$, стабилизованный дисульфидной связью.

"(dsFv)₂" означает два dsFv, соединенных пептидным линкером.

Термин "биспецифичное антитело" или "BsAb" обозначает антитело, в котором сочетаются антиген-связывающие сайты двух антител в пределах одной молекулы. Таким образом, BsAbs способны связываться с двумя различными антигенами одновременно. Все чаще и чаще для разработки, модификации и выработки антител или производных антител с желательным набором свойств связывания и эффекторных функций применяется генная инженерия, как описано, к примеру, в EP 2050764 A1.

Термин "мультиспецифичное антитело" обозначает антитело, в котором сочетаются антиген-связывающие сайты двух или нескольких антител в пределах одной молекулы.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антиген-связывающими сайтами, которые содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L). С помощью линкера, который слишком короток, чтобы позволить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта.

В предпочтительном воплощении эпитоп-связывающий фрагмент выбирается из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диател и V_{HH} .

"Химерное антитело" в настоящем изобретении означает такое антитело, в котором константная область или её часть изменена, заменена или обменена, так что вариабельная область соединяется с константной областью из другого вида или принадлежащей к другому классу или подклассу антител. "Химерное антитело" также означает такое антитело, в котором вариабельная область или её часть изменена, заменена или обменена, так что константная область соединяется с вариабельной областью из другого вида или принадлежащей к другому классу или подклассу антител.

Термин "гуманизированное антитело" означает такое антитело, которое исходно полностью или частично происходит не от человека и которое было модифицировано, чтобы заменить некоторые аминокислоты, в частности, в каркасных участках тяжелых и легких цепей, с тем, чтобы избежать или свести к минимуму иммунный ответ у человека. Константные домены гуманизированных антител по большей части представлены доменами C_H и C_L человека. В одном воплощении гуманизированное антитело имеет константные домены человеческого происхождения. В настоящем изобретении термин "гуманизированное антитело" относится к таким химерным антителам, которые содержат минимум последовательностей, происходящих не из иммуноглобулина человека, например CDRs.

Термин "полипептид" или "связывающий нетрин-1 полипептид" охватывает все эти разновидности антител, их фрагменты или комбинации.

Целью гуманизации является снижение иммуногенности ксеногенного антитела типа антитела мыши для введения в организм человека, сохраняя при этом полное средство связывания с антигеном и специфичность антитела. Гуманизированные антитела или антитела, которые не должны отторгаться другими млекопитающими, могут быть получены с помощью таких технологий, как перестройка поверхности и пересадка CDR. В настоящем изобретении в технологии перестройки поверхности применяется сочетание молекулярного моделирования, статистического анализа и мутагенеза для изменения не относящихся к CDR поверхностей вариабельных областей антител так, чтобы они были похожи на поверхности известных антител намеченного хозяина.

Антитела можно гуманизировать с помощью различных других методов, в том числе пересадки CDR (EP 0239400; WO 91/09967; U.S. Patent Nos. 5530101 и 5585089), замены остатков поверхности или перестройки поверхности (EP 0592106; EP0519596; Padlan (1991) Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci USA. 91:969-973) и перетасовки цепей (U.S. Patent No. 5565332). Человеческие антитела могут быть получены различными методами, известными в данной области, включая методы фагового дисплея. См. также U.S. Patent Nos. 4444887, 4716111, 5545806 и 5814318; и международные патентные заявки WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В контексте изобретения термин "лечить" или "лечение" при использовании здесь означает прекращение, ослабление, торможение прогрессирования или предотвращение того заболевания, к которому этот термин применяется, либо одного или нескольких симптомов такого заболевания.

Термином "лечение рака" в настоящем изобретении обозначается торможение роста злокачественных клеток опухоли и/или прогрессирования метастазов из данной опухоли. Такое лечение может также приводить к регрессии роста опухоли, т.е. к уменьшению размера измеряемой опухоли. В предпочтительном воплощении такое лечение приводит к частичной регрессии опухоли или метастазов. В другом предпочтительном воплощении такое лечение приводит к полной регрессии опухоли или метастазов.

В соответствии с изобретением термин "пациент" или "нуждающийся в этом пациент" обозначает человека или других млекопитающих, пораженных или вероятно пораженных злокачественной опухолью.

В предпочтительном воплощении подлежащий лечению пациент ранее мог получать и другую про-

тивораковую терапию. В частности, подлежащий лечению пациент ранее мог получать терапию на основе оксалиплатина, цисплатина, карбоплатина и/или паклитакселя, доцетакселя.

Под "терапевтически эффективным количеством" полипептида или антитела по изобретению подразумевается достаточное его количество для лечения указанного ракового заболевания при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Однако следует иметь в виду, что общая суточная доза полипептида или антитела по настоящему изобретению устанавливается лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от различных факторов, в том числе подлежащего лечению заболеванию и тяжести заболевания; активности данного конкретного полипептида или антитела; конкретной композиции; возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола и диеты пациента; времени введения, способа введения и скорости выведения данного конкретного полипептида или антитела;

продолжительности лечения; препаратов, используемых в комбинации или одновременно с данным конкретным полипептидом или антителом; и подобных факторов, хорошо известных в области медицины. В предпочтительном воплощении такое терапевтически эффективное количество полипептида или антитела при введении пациенту составляет дозу в пределах от 5 до 500 мг/м², более предпочтительно в пределах от 150 до 450 мг/м² площади поверхности тела.

В следующем воплощении полипептид или антитело по изобретению вводится неоднократно по схеме, которая зависит от подлежащего лечению пациента (возраста, веса, истории лечения и т.д.) и которая может быть установлена квалифицированным врачом.

"Фармацевтически" или "фармацевтически приемлемый" относится к таким молекулярным частям и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других отрицательных реакций при введении млекопитающим, особенно людям, как надлежит. Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель означает нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или рецептурное вспомогательное вещество любого типа.

Форма фармацевтических композиций, содержащих полипептид или антитело по изобретению, и способы введения естественно зависят от подлежащего лечению заболевания, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента и т.п.

Полипептид или антитело по изобретению могут быть составлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, под кожного или внутриглазного введения и т.п. В предпочтительном воплощении полипептид или антитело по изобретению вводится внутривенно.

В частности, фармацевтические композиции, включающие в себя полипептид или антитело по изобретению, могут содержать носители, которые являются фармацевтически приемлемыми для составов, предназначенных для инъекций. В частности, это могут быть изотонические, стерильные, солевые растворы (мононатриевый или динатриевый фосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния либо смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора позволяют составлять растворы для инъекций.

Для приготовления фармацевтических композиций можно растворить или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде эффективное количество полипептида или антитела по изобретению.

Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления их tempo стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы она легко впрыскивалась шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия таких микроорганизмов, как бактерии и грибы.

Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, к примеру, воду, этиanol, полиол (к примеру, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.д.) и подходящие смеси из них. Надлежащую текучесть можно поддерживать, к примеру, при помощи покрытия типа лецитина, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с помощью поверхностно-активных веществ, стабилизирующих средство, криопротекторов или антиоксидантов. Предотвращение действия микроорганизмов может осуществляться с помощью антибактериальных и противогрибковых средств. Во многих случаях предпочтительно следует включать в композицию изотонические средства, к примеру, сахара или хлорид натрия.

Стерильные растворы для инъекций получают путем введения активных соединений в требуемом количестве в соответствующий растворитель с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, по необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилзованных активных ингредиентов в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие нужные ингредиенты из числа тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочт-

тительными способами получения являются методы вакуумной сушки и сушки с замораживанием, которые дают порошок активного ингредиента плюс любых других желательных ингредиентов из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

После приготовления растворы должны вводиться способом, совместимым с дозовой формой, и в таком количестве, которое будет терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в различных дозовых формах типа описанных выше растворов для инъекций, а также можно использовать выделяющие препарат капсулы и пр.

Для парентерального введения в водном растворе, к примеру, раствор должен быть соответствующим образом забуферен, если нужно, а жидкий разбавитель сначала делают изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Именно эти водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, стерильные водные среды, которые можно использовать, должны быть известны специалистам в данной области в свете настоящего описания. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо внести в 1000 мл жидкости для клизмы, либо ввести уколом в предполагаемое место (например, см. "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые вариации в дозировке по необходимости будут иметь место в зависимости от состояния подлежащего лечению субъекта. В любом случае лицо, ответственное за введение, должно определить надлежащую дозу для индивидуального субъекта.

Таблица 1. Описание последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	аминокислотная (а.к.) последовательность (посл.) нетрина-1, причем сигнальный пептид выделен жирным шрифтом, а линейный эпитоп — жирным шрифтом и подчеркнут	MMRAVWEALALA AVACLVGAVRG GPGLSMFA GQAAQPDP CSDENGHP RRCIPDFVNAAFGKDVRVSSTCGRPARYCVVSE RGEERLRSCHLCNASDPPKKAHPPAFLTDLNNPHNLTCWQSEN YLQFPHNVTVTLTSLGKKFEVTVS LQFCSPRPESMAIYKSMDY GRTWVVPFQFYSTQCRKMYNRPRAPITKQNEQEAVCTDSHTD MRPLSGGLIAFSTLDGRPSAHDFDNSPVQLQDWVTATDIRVAFS RLHITFGDENEDDSELARDSYF YAVSDLQVGGRCCKCNGHAAR CVRDRDDSLVCDCRHNTAGPEC DRCKPFHYDRPWQRATA RE ANE CYACNCNLHARRCRFN MELYKLSGRKSGGVCLNCRH NTAGRHC HYCKEGYYR DMGKP ITHR KACKACDCHPVGAAG KTCNQTTGQCPCKDGVGTG ITCNRCAKGYQQSRSP IAPCIKIPV APPTTAASSVEEPEDCDSYCKASKGKLKINMKKYCKKD YAV QIHILKADKAGDWWKFTVNIISVYKQGTSRIRRGDQSLWIRSR DIACKCPKIKPLKKYLLGNAEDSPDQSGIVADKSSLVIQWRD TWARRLRKFQQREKKGKCKKA

2	нуклеотидная нетрина-1	посл.	ATGATGGCGCAGTGTGGGAGGCCTGGCGCGCTGGCGG CGGTGGCGTGCCTGGTGGCGCGTGCAGCGGCGGCGG GCTCAGCATGTTGCGGCCAGCGGCGCAGCCGATCCCT GCTCGGAACGAGAACGGCCAACCGCGCCCGCTGCATCCCGA CTTTGTCATGGCTTCGCAAGGACGTGCGCGTGTCCA GCACCTCGGCCGCCGCCGAGTCCATGGCCATCTA CAAGTCATGGACTACGGCACGTGGTGGCTGCCCTCCAGT TCTACTCACGCAAGTACACGACCGCAC CGCGGCCCATACCAAGCAGAACAGAGCAGGAGGCCG GCACCGACTCGCACACCGGACATGCCGCCCTCTGGCGG CCTCATGCCCTTCAGCACGCTGGACGGGGGCCCTCGGCC ACGACTTCGACAACCTGCCGTGCTGCAAGGACTGGTCAG GCCACAGACATCCGGTGGCTCAGGCCCTGCAACACGTT CGGGGACGAGAACGAGGAGCAGCTGGAGCTGGCGG TCGTACTCTACCGGTGCGACCTGCAAGGGCGCCG GTGCAAGTGCAACCGCACGGGCCGCTGCGTGC CGCGACGAGCAGCTGGTGCAGTGCAAGGCTTCA CCGGCCGGAGTGCAGCGCTGCAAGGCCCT CGGGCCCTGGCAGGAGCAGCCGCAAGGAAACGGT GCGTGGCTGTAACTGCAACCTGCACTGCCGGCTGCGC TTCAACATGGAGGCTCAAGCTTGGGGCGCAAGAGCG GAGGTGCTGCCCTCAACTGTCGCCACAACACGGCG CACTGCCATTACTGCAAGGAGGGCTACTACCGGACATGG GCAAGCCCATCACCCACCGGAAGGCTGCAAAGCCTGTA TIGCCACCCCTGGGTGCTGCGCAAAACCTGCAACAAA CCACCGGCCAGTGTCCCTGCAAGGACGGCGTGA GGTATCACCTGCAACCGCTGCCAACGGCTAC GAGCAGAGCCGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GACGGACTCGAGCCAGCGTGGAGGAGCTGA GATTCCACTGCAAGGGCTCCAAGGGAGGACT ACATGAAAAAGTACTGCAAGAAGGACTATGGCT CCAGATCTGAAGGGGAGCAAGGGGGACTGGTGA AGTGGGGGACACGTGGGCGGGCGCTGCCAAGTCCA GCAGCGTGAAGAAGAGGCAAGTGAAGAAGGCTAGCG VACNCNLHARRCRFNMLEYKLSGRKSGGVCLNCRHTAGR CH
3	а.к. нетрина-1	посл. эпитопа	GTGGCCTGTAACTGCAACCTGCATGCCGGCGCTGCCG CAACATGGAGCTACAAGCTTGGGGCGCAAGAGCG GGTGTCTGCCCTCAACTGTCGCCACAACACC CTGCCAT
4	посл. кДНК нетрина-1	посл. эпитопа	
5	а.к. (IMGT)	посл. CDR1-H	GYTFTSYN

6	а.к. посл. CDR2-H (IMGT)	IYPGNGDT
7	а.к. посл. CDR3-H (IMGT)	ARGGTGFAY
8	а.к. посл. CDR1-L (IMGT)	QSVSND
-	а.к. посл. CDR2-L (IMGT)	YAS
9	а.к. посл. CDR3-L (IMGT и Kabat)	QQDYSSPWT
10	а.к. посл. V _H у 4C11 мыши	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQTLTVTSA
11	а.к. посл. V _L у 4C11 мыши	SIVMTQTPKFLVSAQDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQ SPKLIIYVASNRYTGVPDFRTGSGYGTDFTTISTVQAEDLAV YFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK
12	полная а.к. посл. 4C11 (V _H + C _H IgG1 мыши)	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQTLTVTSAAKTTPPS VYPLAPGAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWSNLSSG VHTFPAVLESIDLTYLSSSVTPSPRSPSETVTCNAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFPPKPKDVLTITLTPKVC VVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSV SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAFAPIEKTSKTKRKPAP QVYTIPPKQEQLMAKDKVSLTCMITDFPPEDITWEWQWNGPA ENYKNTQPIMLNTGSYFYVSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLH EGLHNHHTEKSLSHSPKG
13	полная а.к. посл. 4C11 (V _L + каппа-C _L мыши)	SIVMTQTPKFLVSAQDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQ SPKLIIYVASNRYTGVPDFRTGSGYGTDFTTISTVQAEDLAV YFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFPKDINVWKWIDGSERQNQGVLSWTQDSK DSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRR EC
14	а.к. посл. V _L у гуманизированного варианта 4C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNDVAWYQQKPGK APKLIIYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYY FCQQDYSSPWTFGQG
15	а.к. посл. V _L у гуманизированного варианта 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDVAWFQQRPGQ SPRRLIYASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTTISLEADEAATY YCQQDYSSPWTFGQG
16	а.к. посл. V _L у гуманизированного варианта 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQ APRLLIYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYY FCQQDYSSPWTFGQG
17	а.к. посл. V _L у гуманизированного варианта 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDVAWYLQKPGQ SPQQLIIYASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTTISLEADEAATY YCQQDYSSPWTFGQG
18	а.к. посл. V _L у гуманизированного варианта 4C11	DIVMTQTPSLPVPTGPGEIASICKASQSVSNDVAWYQQKPGQ APRLLIYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYY FCQQDYSSPWTFGQG
19	а.к. посл. V _L у гуманизированного варианта 4C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNDVAWYQQKPGQ APRLLIYASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQDYSSPWTFGQG
20	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA TQQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
21	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTSLSLCAISGYTFTSYNMHWIRQPPG KGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
22	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTSLSLCAISGYTFTSYNMHWVRQAT GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYM MTNMDPVDTATYYCARGGTGFAYWGQG
23	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYNMHWVRQAT GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYM MNSLKTEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
24	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLQESGPGLVKPSQTSLSLCTVSGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYM LSSVTAADTAVYYCARGGTGFAYWGQG
25	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA TQQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
26	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTSLSLCAISGYTFTSYNMHWVRQAT GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVITADKSTSTAYM LSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
27	а.к. посл. V _H у гуманизированного варианта 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYQAQKFKGRVTRDTSSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
28	а.к. посл. CDR1-H (Kabat)	SYNMH
29	а.к. посл. CDR2-H (Kabat)	AIYPGNGDTSYNQKFKG
30	а.к. посл. CDR3-H (Kabat)	GGTGFAY
31	а.к. посл. CDR1-L (Kabat)	KASQSVSNDVA
32	а.к. посл. CDR2-L (Kabat)	YASNRYT
33	прямой праймер	aaaatctgcggaaaggactatgc
34	обратный праймер	ccctgtttatacaggatgc
35	а.к. посл. эпитопа нетрона-1	ARRCRFMELYKLSGRSGGVC
36	посл. κДНК эпитопа нетрона-1	GCCCCGGCGCTGCCGCTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTC GGGGCGCAAGAGCGGAGGTGCTGC

CDRs по IMGT выделены жирным шрифтом в табл. 1, где это уместно.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно на примерах, которые следует рас-

сматривать в качестве неограничительных воплощений.

Фиг. 1. Анализ связывания 4C11 мыши с нетрином-1 человека методом ELISA. Различные концентрации 4C11 инкубировали в 96-луночном микропланшете, покрытом нетрином-1 с меткой FLAG (APOTECH). Связавшиеся антитела 4C11 детектировали с помощью козьего антитела против IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрина (Jackson ImmunoResearch), и хемилюминесцентного субстрата (субстрат ECL для вестерн-блоттинга, Pierce). Люминесценцию считывали на люминометре Tecan Infinite F-500.

Фиг. 2. Ингибиование связывания нетрина-1 с UNC5B-Fc антителом 4C11. Нетрин-1 с меткой FLAG (APOTECH) инкубировали в присутствии различных концентраций 4C11 в 96-луночном микропланшете, покрытом UNC5B-Fc (Netris). Связавшийся нетрин-1 детектировали с помощью антитела против FLAG, конъюгированного с пероксидазой хрина (Sigma), и хемилюминесцентного субстрата (субстрат ECL для вестерн-блоттинга, Pierce). Люминесценцию считывали на люминометре Tecan Infinite F-500.

Фиг. 3. Карттирование линейного эпитопа 4C11 проводили, используя матрицу из 590 линейных пептидов по 15 аминокислот, охватывающих всю последовательность нетрина-1 человека, с перекрыванием между пептидами в 14 аминокислот. Связывание 4C11 с пептидом выявляли с помощью меченного пероксидазой (POD) антитела против IgG мыши и хемилюминесцентного субстрата.

Фиг. 4. Схема, на которой представлена аминокислотная последовательность эпитопа нетрина-1 (расположенного во втором EGF-подобном домене нетрина-1), распознаваемого мышьяким антителом 4C11.

Фиг. 5. Индукция каспазы 3 в альвеолярных базальных эпителиальных клетках A549 аденоакарины человека в присутствии мышьякого антитела 4C11.

Фиг. 6. Ингибиование роста человеческих ксенотрансплантатов у мышей nude, получавших мышье антитело 4C11. Бестимусным (т.е. иммунодефицитным) мышам nude вводили подкожно эпителиальные клетки A549 аденоакариины легких человека. После того, как опухоль достигала примерно 100 mm^3 , мышам ($n = 10$ на группу) вводили внутрибрюшинно раз в неделю по 5 мг/кг 4C11 или изотипичного контроля (MOPC21).

Фиг. 7. Ингибиование роста человеческих ксенотрансплантатов у мышей nude, получавших мышье антитело 4C11. Бестимусным (т.е. иммунодефицитным) мышам nude вводили подкожно клетки Granta-519 мантийноклеточной лимфомы человека. После того, как опухоль достигала примерно 100 mm^3 , мышам ($n = 10$ на группу) вводили внутрибрюшинно 2 мг/кг 4C11 раз в неделю или два раза в неделю или носитель (PBS).

Фиг. 8. Эффект гуманизированного антитела 4C11 (hum03) *in vivo* на рост привитой остеосаркомы крыс. Опухоли остеосаркомы крыс прививали в паратибимальном положении после обнажения надкостицы ($n = 7$). Крысам вводили внутрибрюшинно два раза в неделю по 4,4 мг/кг гуманизированного 4C11 (hum03) или изотипичного контроля с доксорубицином (2 мг/кг) или без него с PBS. На фиг. представлена кратность возрастания опухоли на 17-й день.

Фиг. 9. Анализ методом Pepscan связывающего домена NET1 у гуманизированного моноклонального антитела 4C11 (NET1-H-mAb) против нетрина-1 (HUM03). Необработанные данные Pepscan, полученные при скрининге гуманизированного mAb 4C11 против пептидной библиотеки из 590 перекрывающихся линейных пептидов (ось x). На оси y представлена интенсивность сигнала взаимодействия. Пик соответствует следующей аминокислотной последовательности: ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC (SEQ ID NO: 35).

Пример 1. Получение, скрининг и гуманизация антител

Мыши НТР™ получали 8 инъекций (ежедневно в течение двух дней; первая инъекция в присутствии полного адьюванта Фрейнда, остальные - с неполным адьювантом) по 100 мкг нетрин-1-Fc (Adipogen). Через 2 недели после первой иммунизации проводили слияние с гибридомой (Abpro, Lexington, MA). Супернатанты гибридом подвергали скринингу на специфические моноклональные антитела против нетрина-1 методом ELISA с двойным антигеном (нетрин-1-Fc и посторонний химерный белок Fc). Для отбора моноклональных антител, способных блокировать взаимодействие нетрина-1 с DCC или UNC5h2, использовали вторичный анализ типа ELISA. Затем было выбрано мышье моноклональное антитело (мышье 4C11 или NET1-M-mAb). Это антитело состоит из последовательностей SEQ ID NO: 12 и 13.

Гуманизацию проводили следующим образом. Двухцепочечные фрагменты ДНК, кодирующие последовательности CDR легкой и тяжелой цепи мышьего 4C11, объединяли с пулами каркасных областей человека. Затем вариабельные домены полной длины клонировали в экспрессирующие векторы для млекопитающих. Вариабельные домены легкой цепи клонировали в одной рамке с сигналом секреции и константным доменом каппа человека. Вариабельные домены тяжелой цепи клонировали в одной рамке с лидерной последовательностью и константным доменом IgG1 человека. Разнообразие библиотеки и целостность рамок считывания легкой и тяжелой цепи проверяли секвенированием. Одиночные клоны выстраивали в 96-луночном формате и получали препараты плазмидной ДНК для трансфекции в клетки СНО. Гуманизированную библиотеку трансформировали в клетки СНО в 96-луночном формате. Затем через 48 ч после трансфекции собирали супернатанты из трансформированных клеток СНО и подвергали

скринингу по связыванию нетрина-1 и конкурентным методом ELISA. Вариабельные домены легкой цепи и тяжелой цепи 10 лучших препаратов секвенировали, выравнивали и анализировали. Получали гуманизованные антитела HUM01-10, как описано выше.

Пример 2. Получение mAb и очистка на белке А

Методы получения моноклональных антител на основе последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи, известны специалистам в данной области. Исходя из приведенных здесь последовательностей, специалист может получить различные мышиные, гуманизованные и полностью гуманизованные антитела, направленные против линейного эпитопа по SEQ ID NO: 3 или 35, или любые их варианты типа мышного 4C11 и гуманизованных антител HUM1-10 и HUM1'-10'.

Для получения терапевтических гликопротеинов в качестве хозяина предпочтительны клетки млекопитающих из-за их способности к гликозилированию белков в наиболее совместимой форме для применения на людях (Jenkins et al., Nat Biotech. 1996, 14:975-81). Клетки хозяина из млекопитающих, которые можно использовать, включают клетки HeLa, 283, H9 и Jurkat человека, клетки NIH3T3 и C127 мыши, клетки Cos 1, Cos 7 и CV1 африканской зеленой мартышки, клетки QC1-3 перепела, клетки L мыши и клетки яичников китайского хомячка. Бактерии очень редко гликозилируют белки, и, подобно другим распространенным типам хозяев, таким как дрожжи, мицелиальные грибы, клетки насекомых и растений, дают профили гликозилирования, которые связаны с быстрым выведением из кровотока.

Клетки яичников китайского хомячка (CHO) позволяют устойчиво получать генетически стабильные, высокопродуктивные клоны клеточных линий. Их можно культивировать до высокой плотности в простых биореакторах, используя бессырььевые среды, и они позволяют разрабатывать безопасные и воспроизводимые биопроцессы. Другие часто используемые клетки животных включают почечные клетки детенышей хомячка (BHK), клетки NSO и SP2/0 миеломы мыши. Также было опробовано получение из трансгенных животных (Jenkins et al., Nat Biotech. 1996, 14: 975-81).

Типичный экспрессирующий вектор для млекопитающих содержит промоторный элемент (ранние и поздние промоторы из SV40, длинные концевые повторы (LTR) из ретровирусов, например, RSV, HTLV1, HIV1, и ранний промотор цитомегаловируса (mCMV, hCMV)), который опосредует инициацию транскрипции мРНК, кодирующие белок последовательности и сигналы, необходимые для терминации транскрипции и полиденилирования транскрипта (polyA BGH, polyA гена тимидинкиназы вируса Herpes simplex (TKp), поздний polyA SV40 и polyA 3'-UTR бета-глобина). Дополнительные элементы включают энхансеры (E μ , hIE1), последовательности Козака, сигнального пептида и промежуточные последовательности, flankированные донорными и акцепторными сайтами для сплайсинга РНК. Подходящие экспрессирующие векторы для применения на практике настоящего изобретения включают, к примеру, такие векторы, как pcDNA3.1, pcDNA3.3, pOptiVEC, pRSV, pE μ MCMV, pMCMVHE-UTR-BG, pHCMVHE-UTR-BG, pMCMV-UTR-BG, pHCMV-UTR-BG, pMCMVHE-SV40, pHCMVHE-SV40, pMCMV-SV40, pHCMV-SV40, pMCMVHE-TK, pHCMVHE-TK, pMCMV-TK, pHCMV-TK, pMCMVHE-BGH, pHCMVHE-BGH, pMCMV-BGH, pHCMV-UTR-BGH.

Пустые клетки CHO Easy C котрансформировали экспрессирующим mAb вектором для легких и тяжелых цепей по обычной методике кратковременной или стабильной трансфекции. Секреция H- и L-цепей запускается соответствующей лидерной последовательностью IgH человека. Кодирующие области для легких и тяжелых цепей вводили в экспрессирующий mAb вектор по сайту множественного клонирования. Трансформанты подвергали анализу на правильную ориентацию и рамку считывания, а экспрессирующими вектором трансформировали клетки линии CHO.

Собранный культуральную жидкость, полученную из клеток CHO, наносили на колонку Hi Trap rProtein A (GE Healthcare, Saint Cyr au Mont d'Or, Франция), которую уравновешивали фосфатно-солевым буфером, pH 7,2. Несвязавшиеся белки, которые проходили через колонку, удаляли путем нескольких промывок буфером PBS. MAbs элюировали из колонки с белком A, используя стадию элюирования 0,1 M раствором лимонной кислоты при pH 3,0. Элюент из колонки отслеживали по A₂₈₀. Пики mAb объединяли.

Пример 3. Анализ методом ELISA связывания антител 4C11 с нетрином-1 (фиг. 1)

Белый 96-луночный микропланшет (Costar 3912 Coining) инкубировали в течение ночи при 4°C со 100 нг нетрина-1 с His-меткой (R&D 6419-N1) в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). После трех отмывок по 300 мкл PBS с 0,05% Tween 20 (PBS-T) планшет блокировали добавлением 100 мкл PBS с 3% BSA и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После трех отмывок по 300 мкл PBS-T планшет инкубировали с различными количествами (от 10 до 1200 нг) антител против нетрина-1. После трех отмывок по 300 мкл PBS-T добавляли 100 мкл соответствующего вторичного антитела, коньюгированного с пероксидазой хрена (например, козьего против IgG (Fc) человека, Sigma A0170, или козьего против легкой цепи (kappa) IgG мыши, Jackson ImmunoResearch 115-035-174), разведенного 1/10000 в PBST с 3% BSA, и инкубировали планшет 1 ч при комнатной температуре. После трех отмывок по 300 мкл PBS-T добавляли 100 мкл люминесцентного субстрата HRP (субстрат ECL для вестерн-блоттинга, Pierce). Через 5-10 мин считывали люминесценцию на люминометре Tecan Infinite F-500.

На фиг. 1 представлена типичная зависимость доза-эффект для взаимодействия мышного антитела

4C11 с адсорбированным нетрином-1 при анализе методом ELISA.

Концентрации антител, дающие 50%-е связывание (EC_{50}), рассчитывали из сигмоидальных кривых связывания типа приведенной на фиг. 1. В табл. 1 представлены значения EC_{50} (в нг/мл и в нМ) различных мышиных (полного антитела 4C11, а также Fab- и Fab'_2 -фрагментов) и гуманизованных антител 4C11.

Таблица 1. Активность различных вариантов 4C11 по связыванию с нетрином-1 (пример 3) или по ингибираванию связывания нетрина-1 с UNC5B (пример 5)

	Данные по активности			
	Связывание (EC_{50})		Ингибиование связывания лиганда (IC_{50})	
	нг/мл	нМ	нг/мл	нМ
4C11, IgG1 мыши	57	380	75	502
4C11, IgG2a мыши	63	420	85	567
4C11, Fab	650	13000	844	16880
4C11, Fab'_2	35	350	89	890
HUM01	134	894	54	360
HUM03	166	1107	65	434
HUM09	153	1021	71	474
HUM08	134	894	77	514
HUM06	139	927	82	547
HUM05	151	1007	85	567
HUM07	125	834	89	594
HUM10	211	1407	110	734
HUM04	198	1321	199	1327
HUM02	260	1734	215	1434

Для дальнейших экспериментов было выбрано HUM03. В дальнейшем HUM03 может иногда называться гуманизированным 4C11.

Пример 4. Анализ связывания антител методом поверхностного плазменного резонанса

Анализировали свойства связывания у антител на приборе Biacore T100 (GE Healthcare) с соответствующим программным обеспечением для Biacore T100 Control Biacore T100 Evaluation и чипом CM5-Chip в качестве формата для анализа.

Мышиное антитело 4C11 (IgG1) (SEQ ID NO: 12 и 13) иммунизировали через конъюгированные с аминами захватывающие молекулы. Вводили ряд возрастающих концентраций нетрина-1. В качестве контрольной поверхности сравнения для коррекции на возможные эффекты буфера или неспецифическое связывание нетрина-1 использовали поверхность чипа с одними лишь конъюгированными с аминами захватывающими молекулами.

Захватывающие молекулы: антитела против IgG мыши (козы, Jackson ImmunoResearch).

Конъюгирование захватывающих молекул с аминами. Стандартное конъюгирование с аминами в соответствии с инструкциями изготовителя: рабочий буфер: буфер HBS-N, активация смесью EDC/NHS, намеченная плотность лиганда в 10000 RU; захватывающие антитела разводили в буфере для конъюгирования: 10 mM NaAc, pH 4,5, с = 30 нг/мл; наконец, оставшиеся активированные карбоксильные группы блокировали добавлением 1 М этаноламина.

Иммобилизация антитела 4C11. Иммобилизация антитела 4C11 в проточных кюветах 2-4: скорость потока 5 мкл/мин, время контакта 72 с (антител против IgG мыши) = 5 нМ. Буфер для захвата: PBS (pH 7,4), 0,005% Tween 20.

Анализируемый образец. Измеряли классический ряд концентраций при скорости потока 50 мкл/мин путем последовательного введения анализируемого вещества при 5 или 6 возрастающих концентрациях (с = 2-164 нМ). Рабочий буфер: 20 mM Hepes, pH 7,4, 600 mM NaCl, 0,005% Tween 20. Аналит вводили в течение 3 мин с последующей фазой диссоциации в 90 с.

Полуколичественный анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) кинетики связывания нетрина-1 с иммобилизованным 4C11 проводили по методике анализа Biacore связывания мышного антитела 4C11, представленного и описанного в настоящем изобретении, с нетрином-1 человека. Антитело 4C11 иммунизировали на поверхности чипа через конъюгированные с аминами молекулы антител против IgG (Fc) человека. Вводили ряд возрастающих концентраций нетрина-1 человека и отслеживали кинетику связывания по изменениям SPR. Изменения в виде относительных единиц (RU) в сравнении с контрольным чипом наносили по оси у от времени (ось x). Отмечали репрезентативные кривые ассоциации и диссоциации захваченного 4C11 аналита при различных концентрациях вводимого нетрина-1 человека.

Затем рассчитывали кинетические параметры с использованием обычного двойного сравнения (контрольное сравнение: связывание аналита с захватывающей молекулой; проточная кювета: концентрация нетрина-1 "0" в качестве холостой пробы) и вычисления по модели "кинетика титрования при связывании 1:1".

В табл. 2 приведены данные, измеренные методом SPR (Biacore® T100) при 25°C в PBS.

Таблица 2

	K_a ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
Эксперимент 1	$1,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	13,3
Эксперимент 2	$1,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	12,7

Пример 5. 4C11 ингибитирует связывание нетрина-1 с UNC5B (фиг. 2)

Белый 96-луночный микропланшет (Costar 3912 Corning) инкубировали в течение ночи при 4°C со 100 нг UNC5B-Fc (R&D 1006-UN-050) или DCC-Fc (R&D 844-DC-050) в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). После трех отмывок по 300 мкл PBS с 0,05% Tween 20 (PBS-T) планшет блокировали добавлением 100 мкл PBS с 2% BSA и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После трех отмывок по 300 мкл PBS-T планшет инкубировали 1 час при комнатной температуре со 100 мкл PBS с 1% BSA, содержащего 50 нг/мл нетрина-1 с меткой FLAG (Adipogen) и различные количества (от 0,2 нг до 3000 нг) антитела 4C11. После трех отмывок по 300 мкл PBS-T добавляли 100 мкл моноклонального антитела M2 против FLAG, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Sigma A8592), разведенного 1/5000 в PBST с 1% BSA, и инкубировали планшет 1 ч при комнатной температуре. После трех отмывок по 300 мкл PBS-T добавляли 100 мкл люминесцентного субстрата HRP (субстрат ECL для вестерн-блоттинга, Pierce). Через 5-10 мин считывали люминесценцию на люминометре Tecan Infinite F-500.

На фиг. 2 представлено типичное дозозависимое ингибирование связывания нетрина-1 с UNC5B при возрастающих количествах мышиного антитела 4C11 при анализе методом ELISA.

Концентрации антител, дающие 50%-е ингибирование (IC_{50}), рассчитывали из сигмоидальных кривых связывания типа приведенной на фиг. 2. В табл. 1 представлены значения IC_{50} (в мкг/мл и в нМ) различных мышиных (полного антитела 4C11, а также Fab- и Fab'-фрагментов) и гуманизованных антител 4C11.

Пример 6. Картрирование эпитопа нетрина-1 у мышного 4C11 (фиг. 3 и 4)

Картрирование эпитопа проводили, используя массив из 590 линейных пептидов по 15 аминокислот, охватывающих всю последовательность нетрина-1 человека (без сигнального пептида), с перекрыванием между пептидами в 14 аминокислот. Линейные пептиды синтезировали по стандартной Fmoc-химии и деблокировали с помощью трифтормукопроцесорной кислоты. 455-луночные полипропиленовые карточки в формате кредитных карт, содержащие ковалентно связанные пептиды, инкубировали 30 мин при 25°C в PBST (PBS с 1% Tween 80), содержащем 5% SQ (Super-Q), 4% лошадиной сыворотки (об/об), 5% овальбумина (вес/объем) в PBST. После отмычки пептиды инкубировали с 4C11 (1 мкг/мл) в PBST с 0,1% SQ. После отмычки пептиды инкубировали с коньюгатом антитела против мыши с пероксидазой в разведении 1/1000 (Southern Biotech) в течение 1 ч при 25°C. После промывки добавляли субстрат пероксидазы 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолин сульфонат (ABTS) и 2 мкл 3% H₂O₂. Через 1 ч определяли развитие окраски с помощью камеры с зарядовой связью (CCD) и системы обработки изображений.

Из фиг. 3 видно, что антитело 4C11 специфически взаимодействует с пептидами, входящими в SEQ ID NO: 3: VACNCNLHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTAGRHCН.

На фиг. 4 представлена схема расположения эпитопа, распознаваемого мышным антителом 4C11. Этот эпитоп находится во втором EGF-подобном домене нетрина-1.

Картрирование эпитопа методом PepScan с использованием точечной матрицы из 590 линейных пептидов по 15 аминокислот, охватывающих всю последовательность NET1 человека. Как видно из фиг. 9, антитело HUM03 связывает 8 перекрывающихся пептидов, соответствующих аминокислотной последовательности "ARRCRFNMELYKLSGRKSGG VC" (SEQ ID NO: 35), которая находится в пределах домена V-2 NET1. Таким образом, связывающий эпитоп антитела перекрывается с доменом NET1, участвующим во взаимодействии с UNC5B. Для подтверждения того, что домен V-2 NET1 действительно отвечает за взаимодействие с HUM03, мы создали коллекцию мутантов и провели *in vitro* анализ связывания этих мутантов с антителом, а также с UNC5B. Точечная мутация K358L была достаточна для снижения взаимодействия с HUM03. Тройная мутация R348A-R349A-R351A уменьшала взаимодействие.

Пример 7. 4C11 индуцирует каспазу-3 в эпителиальных клетках А549 adenокарциномы легких человека (фиг. 5)

В 1-й день клетки высевали в лишенную сыворотки среду ($1,8 \times 10^5$ клеток на лунку в 6-луночных планшетах, по 1 мл на лунку). На 2-й день среду заменяли на 1 мл свежей бессывороточной среды, содержащей либо носитель (Ctrl), мышнее антитело 4C11, или постороннее мышнее антитело (Ab) типа IgG1, к (10 мкг/мл). Обработки проводили в двух повторах. На 3-й день собирали клетки из 2-х идентично обработанных лунок и объединяли в один пул. После центрифугирования клеточные осадки ресуспенсировали в 55 мкл лизирующего буфера, представленного в наборе Caspase 3/CPP32 Fluorimetric Assay Kit (Gentaur Biovision, Brussels, Бельгия). Затем определяли апоптоз по измерению активности каспазы-3 с помощью вышеуказанного набора. Все значения нормализовали по контролю.

Из фиг. 5 видно, что мышнее антитело 4C11 индуцирует активность каспазы-3 в эпителиальных клетках А549 adenокарциномы легких человека.

Пример 8. 4C11 вызывает *in vivo* ингибирование роста опухолей у ксенотрансплантатов клеток А549 (эпителиальные клетки adenокарциномы легких человека) (фиг. 6) и клеток Granta (клетки мантий-ноклеточной лимфомы человека) (фиг. 7)

Самок бестимусных мышей nu/nu в 7-недельном возрасте (весом 20-22 г) получали из вивария Charles River. Мышей содержали в стерильных, снабженных сверху фильтром клетках в свободном от патогенов виварии. Все опухоли были имплантированы путем подкожной инъекции опухолевых клеток (10^7 клеток A549 или 10^6 клеток Granta) в 200 мкл PBS в правый бок мышей. Введение антитела 4C11 начиналось после привития опухолей ($V \approx 100 \text{ mm}^3$, примерно через 15-20 дней после инъекции). Мыши получали внутрибрюшинную инъекцию антитела 4C11 (различные дозы и схемы), носителя (PBS) или изотипного контроля (MOPC21) ($n=10$ мышей). Размеры опухолей измеряли с помощью штангенциркуля. Объемы опухолей рассчитывали по формуле $v = 0,5(\text{длина} \times \text{ширина})^2$.

Мыши с ксенотрансплантатами A549 получали 5 мг/кг 4C11 один раз в неделю, а мыши с ксенотрансплантатами Granta получали меньшую дозу 4C11 (2 мг/кг) один или два раза в неделю.

На фиг. 6 и 7 видно значительное подавление роста опухолей из эпителиальных клеток A549 аденокарциномы легких человека (A) и клеток Granta мантийноклеточной лимфомы человека (B) при ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам.

Антитело 4C11 проявляет ингибирование роста опухолей A549 и Granta.

Пример 9. Синергизм между гуманизированным 4C11 (hum03) и доксорубицином на остеосаркоме крыс (фиг. 8)

Индукционная радиацией остеосаркома крыс была преобразована в прививаемую модель при пересадке в паратибиональное положение после обнажения надкостницы (см. Allouche M. et al., 1980, Int. J. Cancer 26, 777-782). Поскольку в этих опухолях не экспрессируется нетрин-1, то экспрессию нетрина-1 и его рецепторов стимулировали с помощью средства химиотерапии (DOX, доксорубицин), как в недавней публикации (см. Paradisi et al., EMBO Mol Med (2013) 5, 1821-1834). Крысы с привитой остеосаркомой получали два раза в неделю внутрибрюшинную инъекцию гуманизированного 4C11 hum03 (4,4 мг/кг) или носителя (ctr). Некоторые животные вдобавок получали внутрибрюшинную инъекцию доксорубицина (2 мг/кг). Размеры опухолей измеряли с помощью штангенциркуля. Объемы опухолей рассчитывали по формуле $v = 0,5 (\text{длина} \times \text{ширина})^2$. Параллельно с этим для отслеживания роста использовали MRI.

Из фиг. 8 видно, что ингибирование роста остеосаркомы достигается у животных, получавших одновременно 4C11 и доксорубицин.

Пример 10. Эффект мышевого 4C11 на воспалительной модели спонтанного рака толстой кишки, вызванного воспалением (мышиная модель связанных с IBD-воспалительной болезнью кишечника - колоректального рака) (см. Proc Natl Acad Sci USA 2009 Oct 6, 106(40): 17146-51)

Мышей обрабатывали АОМ + DSS и вводили PBS или 4C11 внутрибрюшинно по 2 мг/кг два раза в неделю ($n = 7$), как описано ранее (см. Neufert C et al. (2007) Nat Protoc 2: 1998-2004). Вкратце, свободным от патогенов 8-недельным самкам мышей Balb/C дикого типа вводили внутрибрюшинно по 10 мг/кг массы тела АОМ, растворенного в PBS. На следующий день давали 2,5% DSS в питьевой воде в течение 1 недели, а затем в течение 2 недель обычную воду. Мышей обрабатывали DSS в течение 1 недели каждые 2 недели вплоть до 10-й недели эксперимента и вводили по три раза в неделю 4C11 или PBS. Животных забивали в начале 10-й недели и извлекали толстую кишку для гистологического анализа. Из табл. 3 четко видно, что получение мышами антитела 4C11 предотвращает или замедляет развитие вызванной воспалением аденокарциномы толстой кишки.

Таблица 3. Влияние mAb 4C11 против нетрина на вызванные воспалением опухоли толстой кишки *in vivo*.

Мышиная модель связанных с IBD (воспалительной болезнью кишечника) колоректального рака была создана, как описано ранее (Proc Natl Acad Sci USA 2009 Oct 6, 106(40): 17146-51). Мышей сначала обрабатывали азоксиметаном (АОМ) и декстран-сульфатом натрия (DSS), чтобы вызвать колоректальный рак. Мышам вводили PBS или 4C11 внутрибрюшинно по 2 мг/кг два раза в неделю ($n = 7$). Затем мышей забивали. Извлекали толстую кишку и фиксировали в формалине для гистологического анализа. В табл. 3 представлен процент мышей, проявляющих различные предраковые или раковые поражения толстой кишки.

Поражения толстой кишки	Введение	
	PBS	4C11
Очаговая гиперплазия	0%	86%
Слабая аденона	50%	0%
Сильная аденона	16,7%	0%
Ранняя ADK	33,3%	42,8%
ADK	66,7%	14,3%

Пример 11. Определение белка нетрина-1 в раковых клетках человека

Для иммуноблоттинга клетки лизировали обработкой ультразвуком в модифицированном буфере RIPA (50 mM три-НCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 1 mM ЭДТА, коктейль ингибиторов протеаз и 5 mM DTT) и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клеточные остатки осаждали центрифугированием (10000 g, 15 мин при 4°C), а белковые экстракти (200 мкг на полосу) наносили на 10% SDS-полиакриламидный гель и переносили блот на листы PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, США). Фильтры блокировали 10% обезжиренным сухим молоком и 5% BSA в PBS с

0,1% Tween 20 (PBS-T) в течение ночи, а затем инкубировали 2 ч с кроличьим поликлональным антителом против α -нетрина-1 (разведение 1:500, клон H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, США) и мышиным моноклональным антителом против Р-актина (Santa Cruz Biotechnologies). После трех отмылок в PBS-T фильтры инкубировали с соответствующим конъюгированным с HRP вторичным антителом (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) в течение 1 ч. Детектирование осуществляли с помощью системы West Dura Chemiluminescence System (Pierce, Rockford, IL, США).

Для иммунофлуоресцентного исследования клетки отделяли, центрифугировали на покровных стеклах с помощью цитоспинера (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) и фиксировали 30 мин 4%-м (об/об) параформальдегидом. Затем клетки пермабилизировали в течение 30 мин в 0,2% Triton X-100/PBS и блокировали в PBS, содержащем 2% BSA и 2% нормальной ослиной сыворотки. Эндогенный нетрин-1 окрашивали с помощью крысиного моноклонального антитела против α -нетрина-1 (R&D Systems) и ослиного антитела с Alexa-488 против IgG крысы (Molecular Probes). Ядра контрастировали с помощью красителя Hoechst (Sigma).

Пример 12. Примеры раковых заболеваний с гиперэкспрессией нетрина-1 и экспрессией DCC и/или UNC5A и/или B и/или C и/или D в качестве кандидатов на лечение с помощью UNC5-Trap или гуманизированного антитела 4C11

Приводится процент случаев с гиперэкспрессией нетрина-1 для каждого типа рака, при котором проводилось определение экспрессии нетрина-1 и его рецепторов:

60% при метастатическом раке молочной железы (Fitamant et al., PNAS 2008),

47% при немелкоклеточном раке легких (Delloye-Bourgeois et al., JNCI 2009),

38% при агрессивной нейробластоме (Delloye-Bourgeois et al., J. Exp. Med. 2009),

61% при adenокарциноме поджелудочной железы (Link et al., Annals of Chir. Onco. 2007; Dumartin et al., Gastro 2010),

100% при первичной меланоме (n=7) и метастазах меланомы (n=6) (Kaufmann et al., Cellular Oncology 2009),

76% при раке яичников (Panastasiou et al., Oncotarget 2011),

65% при глиобластоме,

60% при остром миелоидном лейкозе и хроническом лиммоцитарном лейкозе,

50% при агрессивной В-клеточной лимфоме,

30% при саркоме,

40% при почечной adenокарциноме,

22% при раке головы и шеи,

при раке яичек (36% при эмбриональной карциноме, 50% при тератоме, 100% при опухолях мешонки),

50% при раке почек,

26% при раке желудка,

19% при раке матки.

Пример 13. Количественный метод ОТ-ПЦР для оценки экспрессии или гиперэкспрессии нетрина-1 в соответствии с РСТ/ЕР2013/068937

Экстрагировали общую РНК с помощью набора NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren, Германия) в соответствии с методикой производителя. Реакции ОТ-ПЦР проводили с помощью набора iScript® cDNA Synthesis Kit (BioRad). Один мкг общей РНК подвергали обратной транскрипции по следующей программе: 25°C в течение 5 мин, 42°C в течение 30 мин и 85°C в течение 5 мин. Для исследования экспрессии намеченные транскрипты амплифицировали в приборе LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science) с помощью набора LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science). Экспрессию целевых генов нормировали по генам глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и фосфоглицераткиназы (PGK) в качестве бытовых генов. Содержание целевых транскриптов, нормированных по бытовым генам, рассчитывали по методу сравнения значений Ст. Проводили проверочный эксперимент для того, чтобы убедиться, что эффективность целевых и бытовых генов примерно одинакова.

Праймеры имели следующие последовательности:

прямой праймер: aaaagtactgcaagaaggatgc, SEQ ID NO: 33,

обратный праймер: ccctgcattatacacggagatg, SEQ ID NO: 34.

Пример 14. Определение белка нетрина-1 в раковых клетках человека в соответствии с РСТ/ЕР 2013/068937

Для иммуноблоттинга клетки лизировали обработкой ультразвуком в модифицированном буфере RIPA (50 mM три-НCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 1 mM ЭДТА, коктейль ингибиторов протеаз и 5 mM DTT) и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клеточные остатки осаждали центрифугированием (10000 g, 15 мин при 4°C), а белковые экстракты (200 мкг на полосу) наносили на 10% SDS-полиакриламидный гель и переносили blot на листы PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, США). Фильтры блокировали 10% обезжиренным сухим молоком и 5% BSA в PBS с

0,1% Tween 20 (PBS-T) в течение ночи, а затем инкубировали 2 ч с кроличьим поликлональным антителом против α -нетрина-1 (разведение 1:500, клон H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, США) и мышиным моноклональным антителом против P-актина (Santa Cruz Biotechnologies). После трех отмылок в PBS-T фильтры инкубировали с соответствующим конъюгированным с HRP вторичным антителом (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) в течение 1 ч. Детектирование осуществляли с помощью системы West Dura Chemiluminescence System (Pierce, Rockford, IL, США).

Для иммунофлуоресцентного исследования клетки отделяли, центрифугировали на покровных стеклах с помощью цитоспинера (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) и фиксировали 30 мин 4%-м (об/об) параформальдегидом. Затем клетки пермеабилизировали в течение 30 мин в 0,2% Triton X-100/PBS и блокировали в PBS, содержащем 2% BSA и 2% нормальной ослиной сыворотки. Эндогенный нетрин-1 окрашивали с помощью крысиного моноклонального антитела против α -нетрина-1 (R&D Systems) и ослиного антитела с A1exa-488 против IgG крысы (Molecular Probes). Ядра контрастировали с помощью красителя Hoechst (Sigma).

Пример 15. Модели ксенотрансплантации *in vivo*

Различные линии клеток человека (эпителиальные линии клеток H358 и A549 adenокарциномы легких и линии клеток Granta-519 мантийноклеточной лимфомы и диффузной крупно-В-клеточной лимфомы OCI-ly3) в фазе экспоненциального роста собирали из культуры, дважды промывали стерильным PBS, подсчитывали и ресуспендировали 5×10^6 клеток в PBS, а затем имплантировали подкожно в правый бок 5-недельным самкам мышей Swiss/nude. Объемы опухолей (V) определяли по формуле: V = 0,5 (длина \times ширина 2) с помощью штангенциркуля. После того, как опухоли достигали 100 ± 20 мм^3 , проводили рандомизацию на группы (по 10 мышей). Мыши вводили внутривенно (H358, A549, OCI-ly3) или внутривенно (Granta-519) антитело против нетрина-1 или изотипный контроль по 10 мг/кг два раза в неделю. Для каждой линии прививаемых клеток определяли процент ингибирования роста опухолей (% TGI) в день (d), указанный в нижеследующей таблице, который рассчитывали по формуле TGI (%) = $(1 - T/C) \times 100$, где T означает средний объем опухолей в исследуемой группе (получавшей антитела против нетрина-1) в день d, а C - средний объем в группе, получавшей изотипный контроль. Значимым считалось ингибирование роста опухолей <50%.

Линии прививаемых клеток человека	Антитело	% TGI	День d после обработки
Granta-519	мышиное 4C11	63	40
H358	гуманизированное 4C11 HUM03	56	40
A549	гуманизированное 4C11 HUM03	40	47
OCI-ly3	гуманизированное 4C11 HUM03	33	20

Мышьи и гуманизированные антитела по изобретению оказывают эффективное ингибирующее действие на рост опухолей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный или очищенный антигенный полипептид нетрина-1, который

имеет последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3, или представляет собой фрагмент последовательности SEQ ID NO: 3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 35, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35 или

кодируется кДНК, имеющей последовательность SEQ ID NO: 4 или её вариант, обусловленный вырожденностью генетического кода, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4,

где указанный антигенный полипептид, способен вызывать образование антитела, которое специфически связывается с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35.

2. Полипептид по п.1, последовательность которого представлена SEQ ID NO: 35, либо последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 35.

3. Полипептид по п.2, кодируемый кДНК с последовательностью SEQ ID NO: 36 или её вариантом, обусловленным вырожденностью генетического кода, или последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 36.

4. кДНК, кодирующая антигенный полипептид нетрина-1 по п.1, имеющая последовательность SEQ ID NO: 4 или 36, или её вариант, обусловленный вырожденностью генетического кода, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4 или 36.

5. Применение полипептида по любому из пп.1-3 для получения моноклонального антитела, которое способно специфически связываться с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35.

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35, или в последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3, причем указанное антитело способно индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или ре-

цепторы DCC.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35, которое содержит CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7, а также CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9, причем антитело способно индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или рецепторы DCC.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с линейным эпитопом нетрина-1 в последовательности SEQ ID NO: 3 или 35, которое содержит CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30, а также CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9, причем антитело способно индуцировать клеточную гибель или апоптоз опухолевых клеток через рецепторы UNC5 или рецепторы DCC.

9. Антитело по любому из пп.6-8, которое содержит вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10 и вариабельный участок легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11.

10. Антитело по п.9, которое содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 12 и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 13.

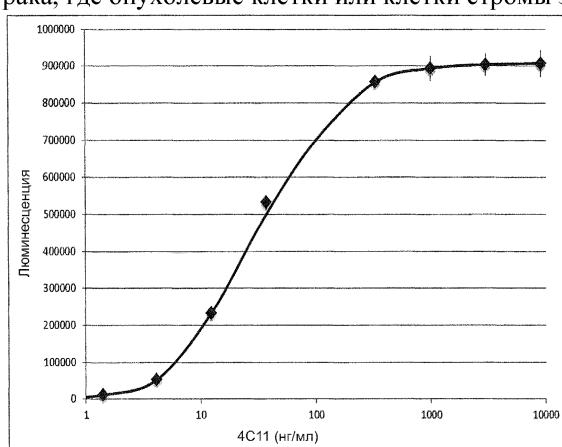
11. Антитело по любому из пп.6-8, которое содержит вариабельный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 14-19, и вариабельный участок легкой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 20-27.

12. Антитело по п.11, которое содержит пару, представленную вариабельным участком тяжелой цепи и вариабельным участком легкой цепи, выбранную из пар SEQ ID NO: 14 и 20; 15 и 21; 16 и 22; 17 и 23; 17 и 24; 16 и 25; 17 и 26; 17 и 22; 18 и 25 и 16 и 21.

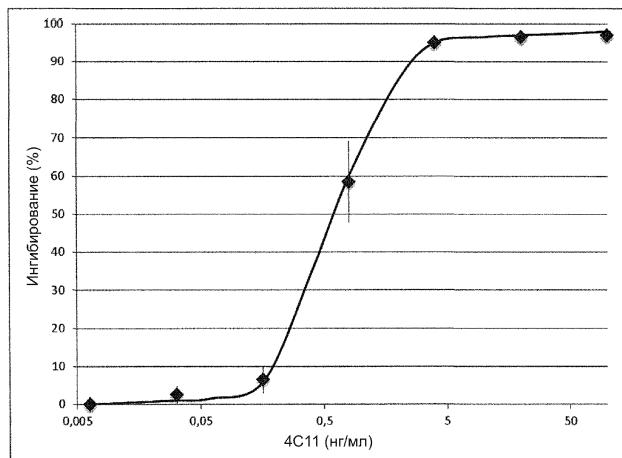
13. Антитело по п.12, которое также содержит константный домен каппа человека в легкой цепи и константный домен IgG1 человека в тяжелой цепи.

14. Фармацевтическая композиция для лечения рака, где раковые клетки или клетки стромы экспрессируют нетрин-1, включающая антитело по любому из пп.6-13 и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

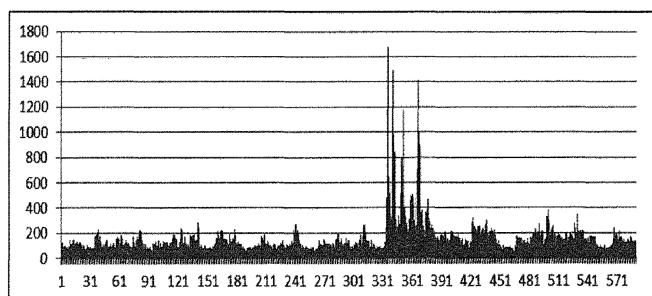
15. Применение антитела по любому из пп.6-13 для изготовления фармацевтической композиции, предназначенной для лечения рака, где опухолевые клетки или клетки стромы экспрессируют нетрин-1.



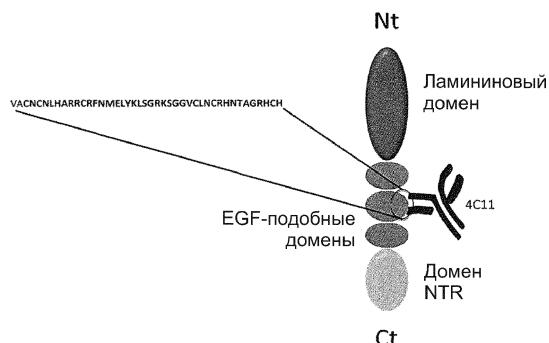
Фиг. 1



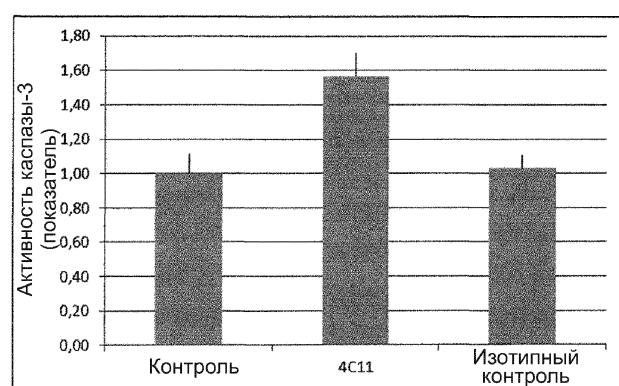
Фиг. 2



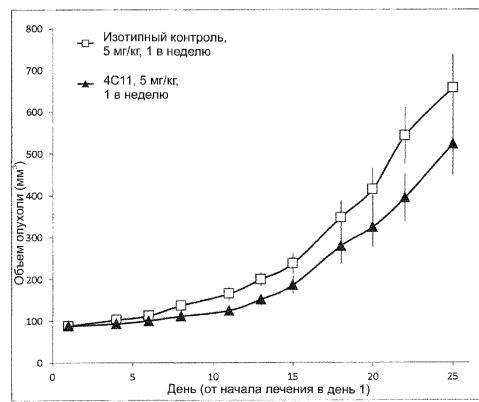
Фиг. 3



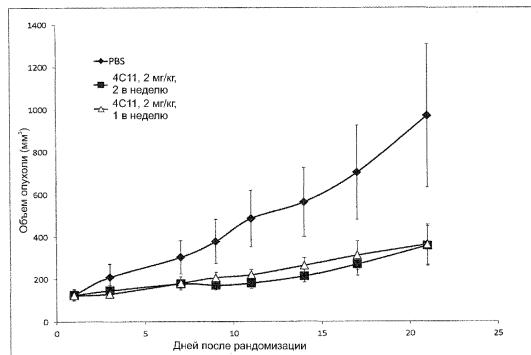
Фиг. 4



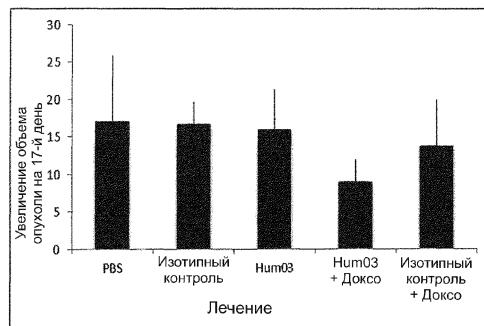
Фиг. 5



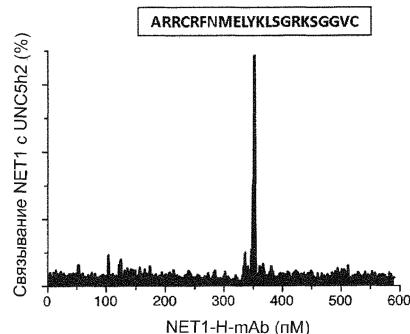
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПО
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2