



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21) (22) Заявка: 2017134875, 31.03.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

31.03.2015 US 62/140,955;

21.08.2015 US 62/283,118

(43) Дата публикации заявки: 06.05.2019 Бюл. № 13

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 31.10.2017

(86) Заявка РСТ:

EP 2016/057164 (31.03.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2016/156545 (06.10.2016)

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ", С.В. Новоселовой

(71) Заявитель(и):

**ОБЛИК ТЕРАПЬЮТИКС АБ (SE)**

(72) Автор(ы):

**ОРВАР Уве (SE),**

**ТРКУЛЬЯ Каролина (SE)**

(54) **НОВЫЕ СПОСОБЫ СЕЛЕКЦИИ ЭПИТОПОВ**

(57) Формула изобретения

1. Способ создания антитела против белка, причем указанный способ включает:
  - (i) идентификацию антигенного эпитопа в указанном белке посредством осуществления воздействия на указанный белок ограниченного или частичного протеолиза путем осуществления контакта указанного белка с по меньшей мере одной протеазой с образованием по меньшей мере одной расщепленной, деконструированной или усеченной версии указанного белка и по меньшей мере одного экспонированного на поверхности пептида, который отщепляется от указанного белка под действием указанной протеазы, и создание антигенного эпитопа на основе указанного экспонированного на поверхности пептида; и
  - (ii) получение антитела против указанного антигенного эпитопа.
2. Способ создания антитела против белка, причем указанный способ включает:
  - (i) осуществление воздействия на указанный белок ограниченного или частичного протеолиза путем осуществления контакта указанного белка с по меньшей мере одной протеазой с образованием по меньшей мере одной расщепленной, деконструированной или усеченной версии указанного белка и по меньшей мере одного экспонированного на поверхности пептида, который отщепляется от указанного белка под действием указанной протеазы; и
  - (ii) идентификацию антигенного эпитопа посредством идентификации экспонированного на поверхности эпитопа среди по меньшей мере одного

экспонированного на поверхности пептида, присутствующего в области указанного белка, которая приводит к утрате или существенному изменению биологической функции указанного белка, когда указанный пептид отщепляют или удаляют от указанного белка в течение ограниченного или частичного протеолиза; или

выбор по меньшей мере одной области-мишени в указанном белке на основании биоинформационных данных и/или известных данных о биологической функции указанного белка и идентификацию антигенного эпитопа посредством идентификации экспонированного на поверхности эпитопа среди по меньшей мере одного экспонированного на поверхности пептида, присутствующего в указанной по меньшей мере одной области-мишени; и

(iii) получение антитела против указанного антигенного эпитопа.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанную по меньшей мере одну протеазу используют в условиях, которые приводят к получению не более чем 8 или не более чем 7, или не более чем 5 экспонированных на поверхности пептидов, или не более чем 8, или не более чем 7, или не более чем 5 уникальных экспонированных на поверхности пептидов, отщепленных от указанного белка под действием указанной протеазы, в образце материала, расщепляемого протеолитическим способом, и при этом несколько образцов необязательно отбирают или анализируют последовательно или параллельно, необязательно через различные периоды времени и/или при различных концентрациях указанной протеазы.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанную по меньшей мере одну протеазу используют в условиях, которые приводят к получению не более чем 8 или не более чем 7, или не более чем 5 экспонированных на поверхности пептидов, отщепленных от указанного белка под действием указанной протеазы.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что кинетическая активность указанной по меньшей мере одной протеазы замедляется настолько, что указанные экспонированные на поверхности пептиды отщепляются по одному в данный момент времени или не более чем по несколько в данный момент времени, например, не более чем 8 или не более чем 7, или не более чем 5 в данный момент времени в образце, и при этом несколько образцов необязательно отбирают или анализируют последовательно или параллельно.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанные отщепленные экспонированные на поверхности пептиды классифицируют на основании порядка их образования после осуществления контакта с указанной по меньшей мере одной протеазой, причем экспонированным на поверхности пептидам, которые отщепляются первыми или при меньших концентрациях указанной протеазы, присваивают высокий класс, и экспонированным на поверхности пептидам, которые отщепляются позже или при более высоких концентрациях указанной протеазы, присваивают низкий класс, и экспонированные на поверхности пептиды, которые отщепляются в промежутке между отщеплением указанных пептидов, необязательно можно классифицировать в порядке их возникновения.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный способ включает выбор экспонированного на поверхности пептида, который характеризуется высоким классом, для разработки антигенного эпитопа и получение антитела против указанного антигенного эпитопа.

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный способ включает выбор экспонированного на поверхности пептида, который характеризуется высоким классом, конструирование антигенного эпитопа на основе указанного экспонированного на поверхности пептида и получение антитела против указанного антигенного эпитопа.

9. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный способ включает выбор

экспонированного на поверхности пептида, который характеризуется высоким классом, соотношение указанного экспонированного на поверхности пептида с определенным биологическим свойством указанного белка, конструирование антигенного эпитопа на основе указанного экспонированного на поверхности пептида и получение антитела против указанного антигенного эпитопа.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что для расщепления, деконструирования и/или усечения указанного белка используют одну протеазу.

11. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что для расщепления, деконструирования и/или усечения указанного белка используют несколько протеаз.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанные несколько протеаз используют последовательно по одной, используют параллельно или используют в едином коктейле из нескольких протеаз.

13. Способ по п. 11 или 12, отличающийся тем, что указанные несколько протеаз используют для идентификации перекрывающихся, комплементарных или уникальных экспонированных на поверхности пептидов.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанная протеаза выбрана из группы, состоящей из: трипсина, протеиназы Arg-C, эндопептидазы Asp-N, клострипаина, глутамилэндопептидазы, Lys-C, Lys-N, химотрипсина, протеиназы K, термолизина, пепсина, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, энтерокиназы, фактора Ха, гранзима В, нейтрофильной эластазы, пролинэндопептидазы, стафилококковой пептидазы I и тромбина.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что указанная протеаза представляет собой трипсин.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой мембранный белок, который присутствует в протеолипосоме, полученной из клеток.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанную протеолипосому иммобилизуют в проточной ячейке для получения неподвижной фазы мембранных белков.

18. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный белок находится в белок-содержащей липидной везикуле, которая является связанной с поверхностью или суспендированной в растворе.

19. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный белок находится в интактной клетке, которая является связанной с поверхностью или суспендированной в растворе.

20. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный белок находится в растворе.

21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой любой белок протеома человека.

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой мембраносвязанный белок, растворимый белок, внеклеточный белок или внутриклеточный белок.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой мембранный или мембраносвязанный белок.

24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой ионный канал суперсемейства TRP (transient receptor potential, с транзиторным рецепторным потенциалом).

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой TRPV1 или TRPV2.

26. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой рецептор возбуждающей аминокислоты.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой NMDA-рецептор или G-белок.

28. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой онкогенный белок.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой онкогенную малую ГТФазу, которая выбрана из группы, состоящей из KRAS, NRAS и HRAS.

30. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой иммуномодулирующий белок.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что указанный белок выбран из группы, состоящей из PD1, PDL1, CD40, OX40, VISTA, LAG-3, TIM-3, GITR и CD20.

32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что указанные отщепленные пептиды идентифицируют путем масс-спектрометрии.

33. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанные отщепленные пептиды идентифицируют путем ЖХ-МС/МС (жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией).

34. Способ по любому из пп. 2-33, отличающийся тем, что указанная биологическая функция выбрана из группы, состоящей из способности указанного белка связываться с мишенью, такой как лиганд или рецептор, ферментативной активности указанного белка, активности ионного канала, активности транспортера и высвобождения, такого как механизм высвобождения и поглощения инсулина.

35. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что получение антитела против указанного антигенного эпитопа осуществляют посредством гибридной технологии, технологии фагового дисплея или посредством иммунизации животного указанным антигенным эпитопом.

36. Способ согласно любому из пп. 1-35, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное или поликлональное антитело.

37. Антитело, полученное способом по любому из пп. 1-36.

38. Антигенный эпитоп TRPV1, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:

LLSQDSVAASTEK (SEQ ID NO: 2);

LLSQDSVAASTEKTLR (SEQ ID NO: 3); и

QFSGSLKPDAEVFKSPAASGEK (SEQ ID NO: 4).

или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены или делеции аминокислот по сравнению с данной аминокислотной последовательностью, или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична данной аминокислотной последовательности, или представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере 6 последовательных аминокислот данной аминокислотной последовательности.

39. Антигенный эпитоп TRPV1, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:

LLSQDSVAASTEKTLRLYDRRS (SEQ ID NO: 5); и

GRHWKNFALVPLLRE (SEQ ID NO: 6).

40. Антигенный эпитоп TRPV1, содержащий аминокислотную последовательность LVENGADVQAAAHGDF (SEQ ID NO: 7) или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,

причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены или делеции аминокислот по сравнению с данной аминокислотной последовательностью, или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична данной аминокислотной последовательности, или представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере 6 последовательных аминокислот данной аминокислотной последовательности.

41. Антигенный эпитоп TRPV1, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:

DGPTGARLLSQ (SEQ ID NO: 8); и  
DAEVFKSPAASGEK (SEQ ID NO: 9).

или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены или делеции аминокислот по сравнению с данной аминокислотной последовательностью, или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична данной аминокислотной последовательности, или представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере 6 последовательных аминокислот данной аминокислотной последовательности.

42. Антигенный эпитоп TRPV1, содержащий аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из:

SQDSVAASTEKTL (SEQ ID NO: 10); и  
SGSLKPEDAEVF (SEQ ID NO: 11).

или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены или делеции аминокислот по сравнению с данной аминокислотной последовательностью, или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична данной аминокислотной последовательности, или представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере 6 последовательных аминокислот данной аминокислотной последовательности.

43. Антигенный эпитоп TRPV1, содержащий аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из:

VSPVITIQRPGD (SEQ ID NO: 12);  
VSPVITIQRPGDGPTGA (SEQ ID NO: 13);  
LNLHDGQNTTIPLLL (SEQ ID NO: 14);  
YTDSYYKGQ (SEQ ID NO: 15);  
SLPSESTSH (SEQ ID NO: 16);  
EDPGNCEGVKR (SEQ ID NO: 17);  
DRQSAQPEEVYLR (SEQ ID NO: 18); и  
QSAQPEEVYLR (SEQ ID NO: 19);

или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены или делеции аминокислот по сравнению с данной аминокислотной последовательностью, или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична данной аминокислотной последовательности, или представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере 6 последовательных аминокислот данной аминокислотной последовательности.

44. Антигенный эпитоп TRPV2, содержащий аминокислоту, которая выбрана из

группы, состоящей из:

FAPQIRVNLNYRKGTG (SEQ ID NO: 20);

ASQDPNRFDRDR (SEQ ID NO: 21);

LNLKDGVNACILPLL (SEQ ID NO: 22);

CTDDYYRGH (SEQ ID NO: 23);

LVENGANVHARACGRF (SEQ ID NO: 24);

EDPSGAGVPR (SEQ ID NO: 25); и

GASEENYVPVQLLQS (SEQ ID NO: 26).

или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены или делеции аминокислот по сравнению с данной аминокислотной последовательностью, или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична данной аминокислотной последовательности, или представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере 6 последовательных аминокислот данной аминокислотной последовательности.

45. Антитело против антигенного эпитопа по любому из пп. 38-44.

R U 2 0 1 7 1 3 4 8 7 5 A

R U 2 0 1 7 1 3 4 8 7 5 A