



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121844** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 1/00

A61P 11/00

A61P 25/00

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 29/00

A61P 33/00

A61P 37/00

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 11147**

(22) Дата подання заявки: **14.03.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.08.2020**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **61/611,332**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **15.03.2012**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **26.01.2015, Бюл.№ 2**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2020, Бюл.№ 15**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/US2013/031314,
14.03.2013**

(72) Винахідник(и):
**Чень Джон (US),
Франссон Йохан (US),
Фурсов Наталі (US),
Хемел Деймон (US),
Маліа Томас (US),
Обмолова Галіна (US),
Орт Татьяна (US),
Райсайзін Майкл (US),
Скаллі Майкл (US),
Світ Реймонд (US),
Тепляков Алексєй (US),
Уілер Джон (US),
Альмагро Хуан Карлос (US)**

(73) Власник(и):
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК.,
800/850 Ridgeview Drive, Horsham,
Pennsylvania 19044, United States of America
(US)**

(74) Представник:
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.
№367**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:
US 20100173324 A1, 08.07.2010
US 20110274685 A1, 10.11.2011
WO 2012004367 A1, 12.01.2012
US 20120093805 A1, 19.04.2012

UA 121844 C2

(54) ЛЮДСЬКЕ АНТИТІЛО ДО CD27, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Людські антитіла, імуноспецифічні для людського CD27, здатні блокувати зв'язування CD27 з його лігандом CD70 і нейтралізувати біологічну активність CD27, включаючи, крім іншого, наступне: внутрішньоклітинне сигналізування CD27, проліферацію і активацію Т-клітин, проліферацію і диференціацію В-клітин, утворення бластних клітин плазми і полегшення

відповідей антитіл, стимулювання пухлинних клітин за допомогою CD70, а також вироблення розчинних медіаторів з Т- і В-клітин. Антитіла можуть бути використані в діагностиці або лікуванні захворювань і станів, що асоціюються з активністю CD27.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВИНАХОДА

Область застосування винаходу

Наявний винахід відноситься до людських антитіл до білка CD27 і методів їх застосування, зокрема – до людських антитіл до білка людини CD27 і методів їх застосування при лікуванні запальних захворювань.

Попередній рівень техніки

CD27 є трансмембранним білком 1-го типу та членом суперсімейства рецептора ФНП (TNFSF27), що експресується в якості поверхневого антигену на більшості Т-клітин, природних кілерів, антитілосекретуючих плазматичних клітин і В-клітин пам'яті. CD70 являє собою цитокін, що також є членом суперсімейства лігандів фактора некрозу пухлини 7 (TNFSF7) і когнатним лігандом для CD27. Взаємодії ліганда TNFSF з рецептором здатні регулювати диференціацію Т-залежних В-клітин (Jacquot S. 2000 Immunol Res. 21 (1):23-30) і індукують апоптоз клітин в різних клітинах.

CD27: результати лігування CD70 в активації канонічних і неканонічних NF- κ B сигнальних шляхів, що, в свою чергу, стимулює проліферацію В-і Т-клітин, диференціацію плазматичних клітин і подальшу секрецію антитіл (Yamamoto, H. 1998 J Immunol. 161 (9): 4753-9). Костимуляція CD27 за допомогою OX40, 4-1BB також сприяє виживанню активованих Т-клітин (Croft, M. 2003 Cytokine Growth Factor Rev. 14(3-4): 265-73), тим самим регулюючи кількість ефektorних клітин і Т-клітин пам'яті, а також керує функцією Т-клітин, безпосередньо стимулюючи вироблення цитокінів, таких як ІЛ-4 та гамма-інтерферон, або модулюючи відповіді Т-клітин на дії інших цитокінів, таких як ІЛ-2 і ІЛ-12.

Дослідження, проведені як на людях, так і на тваринах, свідчать про важливу роль шляху CD27:CD70 в різних імунних захворюваннях, включаючи системний червоний вовчак (SLE) (Doerner T Lupus 2004 13 (5):283-9), ревматоїдний артрит (Tak, PP et al. 1996 clin Immunol Immunopathol 80 (2): 129-38) і розсіяний склероз (Hintzen RQ et al. 1991 J Neuroimmunol 35 (1-3):211-7). З іншого боку, CD70, як повідомлялося, експресується в різному ступені на злоякісних в-клітинах, і комплекс CD70:CD27 здатний передавати протипухлинну відповідь за допомогою активації протипухлинного імунітету і зниження зростання пухлини (Borst J, Hendriks J and Xiao Y. 2005. Curr Opin Immunol. 17 (3):275-81). CD27 також може контролювати накопичення CD4 + і CD8 + Т-клітин в місцях інфекції (Hendricks et al. 2000 Nature Immunol 1, 433 – 440).

CD70 не експресується на нормальних, не кровотворних клітинах. Експресія CD70, можливо, тимчасово обмежена антиген-активованими Т-і В-клітинами і його експресія пригнічується при припиненні антигенної стимуляції. Дані з експериментальної моделі на тваринах показують, що CD70 може сприяти розвитку імунологічних розладів, таких як, наприклад, ревматоїдний артрит (Brugnoni et al., 1997 Immunol. Lett. 55:99-104), псоріатичний артрит (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104) і вовчак (Oelke et al., 2004, Arthritis Rheum. 50:1850-60). На додаток до своєї можливої ролі в запальних відповідях, CD70 також експресується на різних трансформованих клітинах, включаючи в-клітини лімфоми, клітини Ходжкіна і Ріда-Штернберга, злоякісні клітини неврального походження і ряд карцином.

Агоніст-зв'язуючі антитіла до CD27, що описані в патенті W02008 / 051424 (Univ. South Hampton), були відзначені в якості корисних для стимуляції Т-клітинного імунітету і такі антитіла мають зв'язуючий епітоп, який забезпечує їх незмінність (відсутність інгібування) CD70.

У той час як дослідження на гризунах, пов'язані зі зміною CD27 і / або CD70, продемонстрували потенційно важливу роль взаємодії цього ліганда рецептора, є необхідність у створенні людських антитіл, специфічних для людського CD27 та інших блокуючих агентів взаємодії CD27:CD70, які можуть надавати клінічно корисну цитотоксичну, цитостатичну або імуномодулюючу дію на CD27-експресуючі клітини, зокрема не надаючи небажаного агоністичного впливу на CD27-експресуючі клітини при відсутності CD70. Такі сполуки можуть бути корисними лікарськими засобами для модулювання розвитку неопластичних клітин або імунних захворювань, що опосередковані CD27-експресуючими клітинами.

Короткий опис винаходу

Цей винахід пропонує людські моноклональні антитіла, що зв'язуються з CD27 та здатні блокувати дії, пов'язані із взаємодією CD27-CD70 на клітини, тканини або органи суб'єкта-носія. Пропонуються послідовності амінокислот зразкових моноклональних антитіл, що зв'язуються з CD27, які кодуються нуклеїновими кислотами для експресії в клітині-господарі. Крім того, CD27 моноклональні антитіла даного винаходу визначають щонайменше три епітопи, що не перекриваються на позаклітинному домені CD27, у яких при зачепленні з антитілом даного винаходу не відбувається активація сигнального шляху лігування ліганда типу CD70 і низхідної біологічної активності.

Іншим аспектом цього винаходу є виділене анти-CD27 антитіло, яке реагує з епітопом білка CD27, визначеного залишками між позиціями 21-191 білка CD27.

Інший аспект цього винаходу являє собою виділене антитіло, що має послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, вибраної з послідовностей, показаних під Пор. ід. №: 76, 78, 80, 102-126, 128-136 і 145-147, а також послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, вибраної з послідовностей, показаних під Пор. ід. №: 77, 79, 81-101, 127, 137-144 і 148, включаючи варіанти цих послідовностей, наприклад, консервативні заміни.

Ще один аспект цього винаходу являє собою виділене антитіло, яке має CDR послідовності важкого і легкого ланцюгів, що вибрані з послідовностей, показаних під Пор. ід. №: 1-75 і 151-158, включаючи варіанти цих послідовностей, наприклад, консервативні заміни.

Іншим аспектом цього винаходу є виділений полинуклеотид, що кодує антитіло даного винаходу.

В іншому аспекті даний винахід належить до антитіла, що пов'язується із загальним епітопом, певною ділянкою білка, з яким пов'язуються антитіла C2177 та / або C2186 або людські антитіла, отримані з них, що описані в таблицях 30-39, або ті, що конкурують за зв'язування з білком CD27 з антитілами C2177 і / або C2186 або людськими антитілами, отриманими з них, що описані в таблицях 30-39. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід відноситься до антитіла, що зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD27, визначеного ділянкою білка, з яким зв'язується антитіло C2191 або людські антитіла, отримані з нього, що описані в таблицях 30-39; і конкурує за зв'язування з білком CD27 з антитілом C2191 або людськими антитілами, отриманими з них, що описані в таблицях 30-39. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід відноситься до антитіла, що зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD27, визначеного ділянкою білка, з яким зв'язується антитіло C2192 або людські антитіла, отримані з нього, що описані в таблицях 30-39; і конкурує за зв'язування з білком CD27 з антитілом C2192 або людськими антитілами, отриманими з них, що описані в таблицях 30-39. В іншому аспекті винахід містить антитіло або його фрагмент, отриманий з одного або більше ніж одного антитіла C2177, C2186, C2191 і C2192 або людських антитіл, отриманих з них, що описані в таблицях 30-39, що мають інші функціональні характеристики зв'язування, що наведені одним або більше ніж одним антитілом C2177, C2186, C2191 і C2192 або людськими антитілами, отриманими з них, які описані в таблицях 30-39, такі як інгібування зв'язування CD27 з CD70-позитивними клітинами.

Таким чином, один аспект даного винаходу стосується сконструйованого антитіла, що містить сконструйований (наприклад, гуманізований або адаптований до людини) важкий і легкий ланцюг, де:

(1) варіабельна ділянка сконструйованого важкого ланцюга містить або отримана з одного або декількох ділянок, що визначають компліментарність (CDR) з важкого ланцюга мишачих антитіл C2177, C2191, C2192 і C2186 та каркасної ділянки із важкого ланцюга людського акцепторного антитіла, а також додатково має одну або кілька заміни залишків людської каркасної ділянки, а також

(2) варіабельна ділянка сконструйованого легкого ланцюга містить одну або кілька ділянок, що визначають компліментарність з легкого ланцюга мишачих антитіл C2177, C2191, C2192 і C2186 та каркасної ділянки з легкого ланцюга людського акцепторного антитіла, а також додатково має одну або кілька заміни залишків людської каркасної ділянки; і

(3) сконструйоване антитіло специфічно зв'язується з людським CD27 і перешкоджає його взаємодії з CD70.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу сконструйоване антитіло може складатися з однієї або декількох CDR, що потім конструюються за допомогою однієї або декількох заміни або делецій, наприклад, ті, які на 90 %, 95 %, 98 % або 99,5 % ідентичні одній або декільком CDR антитіл C2177, C2191, C2192 і / або C2186.

Інший варіант здійснення даного винаходу відноситься до лікування або профілактики патологічних станів, пов'язаних з біологічною активністю CD27 шляхом введення терапевтично або профілактично ефективної кількості антитіла за даним винаходом, його частини, або суміші антитіл даного винаходу або їх частин пацієнту, який потребує такого лікування.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає епітопи антигену в якості компонента вакцини. Поліпептиди або полинуклеотиди, що кодують поліпептидні епітопи, описані вище, містять субфрагменти або тривимірні аналоги деяких або всіх з послідовностей під Пор. ід. №: 1 залишки 21-191 або їх консервативні зміни визнаються антитілами за даним винаходом. Поліпептиди і полинуклеотиди можуть бути використані для активної імунізації носія для активації вироблення антитіл проти CD27, здатних побороти або запобігти патологічним станам, пов'язаним з біологічною активністю CD27.

Винахід також відноситься до способів отримання, очищення, розробки та упаковки антитіла згідно з винаходом для застосування в лікуванні або профілактиці патологічних станів, пов'язаних з біологічною активністю CD27, шляхом введення терапевтично або профілактично ефективною кількості антитіла або його частини.

5 Короткий опис малюнків

 ФІГ. 1 являє собою графік, що показує ефекти антитіла C2177

 на проліферацію Т-клітин.

 ФІГ. 2 показує кристалічну структуру потрійного комплексу CD27:C2177:C2191. N-і C-кінцеві ділянки фрагмента CD27 помічені. Важкі ланцюги Fab-фрагментів темніші, ніж їхні легкі ланцюги.

 ФІГ. 3 являє собою схему контактів білка CD27 – антитіла C2177 із залишками білка CD27 (епітопами), що обведені колами і залишками антитіла C2177 (паратопами), що обведені прямокутниками.

 ФІГ. 4 являє собою схему контактів білка CD27 – антитіла C2191 із залишками білка CD27 (епітопами), що обведені колами і залишками антитіла C2191 (паратопами), що обведені прямокутниками.

 Детальний опис

 Скорочення

 CDR – ділянка, що визначає компліментарність; CFSE – карбоксифлуоресцеїн діацетат, сукцинімідил ефір; ECD – позаклітинний домен; FR – каркасна ділянка; H – важкий ланцюг; GvHD реакція "трансплантат проти хазяїна"; L – легкий ланцюг; IFN – інтерферон (γ, гамма); Ig – імуноглобулін; Mab – моноклональне антитіло; MMP – матриксна металопротеїназа; PBMC – моноклеарні клітини периферичної крові; VL – варіабельна ділянка легкого ланцюга; VH – варіабельна ділянка важкого ланцюга

 Визначення

 У цьому документі під терміном "антитіло" маються на увазі цільні антитіла і будь-який антигензв'язуючий фрагмент або його одиночний ланцюг. Таким чином, антитіло містить будь-який білок або пептид, що містить молекулу, яка містить щонайменше частину молекули імуноглобуліну, що містить, крім іншого, наступним: щонайменше одна ділянка, що визначає компліментарність (CDR) важкого або легкого ланцюга або його лігандзв'язуюча частина, варіабельна ділянка важкого ланцюга або легкого ланцюга, константна ділянка важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасна (FR) ділянка або будь-яка його частина або щонайменше одна частина зв'язуючого білка, яка може бути вбудована в антитіло цього винаходу. Вважається, що термін "антитіло" додатково охоплює антитіла, фрагменти розщеплення, їх конкретні частини і варіанти, включаючи антитіла-міметики або антитіла, що містять фрагменти антитіл, що імітують структуру і / або функцію антитіла або його конкретного фрагмента або частини, включаючи одноланцюгові і однодоменні антитіла та їх фрагменти. Функціональні фрагменти містять антигензв'язуючі фрагменти для попереднього обраної мішені. Приклади зв'язують фрагментів, які охоплюються терміном "антигензв'язуюча частина" антитіла, містять (i) Fab-фрагмент, моновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH; (ii) F (ab')₂-фрагмент, двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагмента, пов'язаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, що складається з доменів VH і CH; (iv) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла; (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), що складається з домену VH; і (vi) виділена ділянка, що визначає компліментарність (CDR). Крім того, незважаючи на те, що два домена Fv-фрагмента (VL і VH) кодуються окремими генами, з використанням рекомбінантних способів, їх можна з'єднувати синтетичним лінкером в єдиний білковий ланцюг зі спареними областями VL і VH, що утворюють моновалентні молекули (відомі як одноланцюгова Fv (scFv); див., наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423-426, and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Також передбачається, що такі одноланцюгові антитіла також охоплюються терміном "антигензв'язуюча частина" антитіла. Такі фрагменти антитіл отримують з використанням традиційних методів, відомих фахівцям у даній області, а відбір фрагментів на можливість використання проводять таким же чином, як і інтактні антитіла. З іншого боку, можна використовувати бібліотеки конструктів scFv для відбору на антигензв'язуючу здатність, а потім, використовуючи традиційні методи, провести їх сплайсинг з іншими ДНК, що кодують людські послідовності зародкової лінії. Одним із прикладів такої бібліотеки є HuCAL: Людський Combinatorial Antibody Library (Knappik, A. et al. J Mol Biol (2000) 296 (1):57-86).

 Термін "CDR" означає ділянку, що визначає компліментарність, або гіперваріабельну ділянку амінокислотного залишку антитіла, яка бере участь в або відповідає за зв'язування з антигеном. Гіперваріабельна ділянка або CDR людського підтипу IgG антитіла містить залишки

амінокислот із залишків 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3) в варіабельному домені легкого ланцюга 31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) в варіабельному домені важкого ланцюга, як описано в Kabat et al. (1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.). Та / або ті залишки з гіперваріабельної петлі (наприклад, залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) в варіабельному домені легкого ланцюга і 26-32 (H1), 53-55 (H2) або поточне визначення H2 Chothia 52-57 і 96-101 (H3) в варіабельному домені важкого ланцюга, як описано (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)).

Каркасна ділянка або залишки FR1-4 є залишками варіабельної домену, що відрізняються від та вкладають у дужки гіперваріабельні ділянки. Останнім часом було розроблено і широко впроваджено універсальну систему нумерації – міжнародну інформаційну систему ImMunoGeneTics® (IMGT) (LaFranc, et al., 2005 p., Nucl Acids Res. 33:D593-D597).

У цьому документі CDR позначають як за амінокислотною послідовністю, так і за положенням в легкому або важкому ланцюзі в послідовній нумерації. Оскільки "положення" CDR в структурі варіабельного домену імуноглобуліну зберігається між видами і присутнє у структурах, званих петлями, за допомогою системи нумерації, яка вирівнює послідовності варіабельного домену у відповідності зі структурними особливостями, CDR і каркасні залишки легко ідентифікуються. Ця інформація використовується в трансплантації і заміні залишків CDR імуноглобулінів одного виду на каркасну ділянку акцептора, як правило, з людського антитіла.

Термін "CD27" відноситься до суперсімейства людського рецептора ФНП (TNFSF27), продукту людського гена 939 (гена CD27), також іменованого людським рецептором CD27L, MGC20393, S152, T14, Т-клітинному активаційному антигену CD27 і включає всі варіанти, ізоформи і гомологи видів CD27. Експресований людський CD27 (Національний центр біотехнологічної інформації Номер доступу NP_001233) є поліпептидом 260 амінокислот, які на N-кінцевому фрагменті мають 20-амінокислотний сигнал секреції. Таким чином, антитіла за даним винаходом в деяких випадках можуть вступати в перехресну реакцію з CD27 інших видів крім людського. В інших випадках антитіла можуть бути повністю специфічними для людського CD27 і не показувати видову перехресну реактивність або перехресну реактивність інших типів. Під біологічною активністю CD27 розуміють будь-які спадні активності, що виникають в результаті зв'язування та / або активації рецептора CD27 в результаті активації CD27 одним або декількома лігандами, особливо поліпептидами CD70 (TNFSF7, NP_001243) або іншими лігандами, такими як SIVA. CD27 перетворює сигнали, що призводить до активації NF-κ-β і MAPK8 /JNK. Адапторні білки TRAF2 і TRAF5 показали опосередкування процесу сигналізування даного рецептора. Біологічні активності CD27 можуть також виникати в результаті зв'язування певних процесованих форм CD27 або фрагментів CD27 з лігандами, що самі собою виявляють біологічну активність, наприклад, поліпептид, що складається з приблизно 21-191 залишку непроцесованого білка, може зв'язуватися з CD70. Цитоплазматичний кінцевий сегмент антигену CD27, залишки 213-260, зв'язується з N-кінцевим фрагментом білка SIVA (також має назву "фактор, що індукуює апоптоз": CD27BP; SIVA1, Siva-1, NP_006418 (175 aa)); і Siva-2, SIVA2, NP_068355 (110 aa).

Термін "епітоп" означає білкову детермінанту, здатну до специфічного зв'язування з антитілом. Епітопи зазвичай складаються з хімічно активних поверхнево розташованих груп молекул, таких як амінокислотні або цукрові бічні ланцюги, а також зазвичай мають специфічну тривимірну структуру, а також специфічні зарядові характеристики. Конформаційні і неконформаційні епітопи різняться тим, що в присутності денатуруючих розчинників втрачається зв'язування з першими, але не втрачається з другими.

"Гуманізація" (також іменована реконструюванням або CDR-трансплантацією) або "інженерія" включає встановлені методи зниження імуногенності моноклональних антитіл (mAbs) з ксеногенних джерел (як правило, гризунів) і поліпшення афінності або ефекторних функцій (ADCC, активація комплементу, зв'язування C1q). Сконструйоване моноклональне антитіло можна виробляти з використанням методів молекулярної біології, за допомогою відображуваних фагом рандомізованих послідовностей або синтезованих "de novo". Наприклад, з метою створення гуманізованого антитіла з включеними ділянками CDR нелюдських видів, проект може містити варіації, такі як консервативні заміни амінокислот у залишках CDR і зворотню заміну залишків нелюдського моноклонального антитіла на людські каркасні ділянки (зворотні мутації). Позиції можна розрізнити або ідентифікувати за допомогою методів порівняння послідовностей, аналізу узгодженої послідовності або структурного аналізу 3D структури варіабельних ділянок. Існують комп'ютерні програми, які ілюструють і відображають можливі тривимірні конформаційні структури обраних потенційних послідовностей імуноглобулінів. Вивчення цих зображень дозволяє проаналізувати ймовірну роль залишків у функціонуванні потенційної послідовності імуноглобуліну, тобто провести аналіз залишків, які

впливають на здатність потенційного імуноглобуліну до зв'язування зі своїм антигеном. Таким же чином або за допомогою алгоритмів вирівнювання простих послідовностей (наприклад, Clustal W) можна вибирати залишки FR (каркасної ділянки) з відомих послідовностей антитіла, які можна знайти в таких загальнодоступних базах даних як VBASE або Kabat, а узгоджені послідовності оптимізовані таким чином, що для цільового (-их) антигену (-ів) архівується бажана характеристика антитіла, як, наприклад, афінність. Оскільки набори даних відомих параметрів структур антитіла збільшуються, теж саме відбувається з софістикою та удосконаленням цих технологій. Іншим підходом до гуманізації є зміна тільки поверхневих залишків послідовностей гризунів з найбільш поширеними залишками з тих, що знайдені в людських моноклональних антитілах і звуться терміном "зміна поверхні" чи "покриття." На сьогоднішній день відомою і загальнодоступною є велика кількість послідовностей як людських, так і нелюдських імуноглобулінів, які застосовуються фахівцями в даній області, наприклад, база даних та інструменти, розроблені LeFranc et al можна знайти під назвою IMGt; веб-сайт, якуратором якого є Національний Центр Біології США (NCBI); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health (1983) на сьогоднішній день також значно розширена і доступна в режимі онлайн, кожна з них включена в даний документ за посиланням. Гуманізацію або інженерію антитіл можна виконувати з використанням будь-якого відомого методу або розробленого з використанням інформації про послідовності людського імуноглобуліну. Такі методи описані, наприклад, в патентах Winter US Pat No. 6982361 and Bowdish et al. WO03/025019, зміст яких включений в даний документ за посиланням.

При використанні в цьому документі K_D означає константу дисоціації, зокрема K_D антитіла для заданого антигену. Вона являє собою міру афінності антитіла до конкретної мішені. Високоафінні антитіла мають $K_D = 10^{-8}$ М або менше, більш переважно 10^{-9} М або менше, ще більш переважно 10^{-10} М чи менше відносно заданого антигену. Зворотньою K_D , є K_A , константа асоціації. Передбачається, що використовуються в цьому документі терміни " k_{dis} ", або " k_2 ", або " k_d " означають швидкість дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген. " K_D " -це відношення швидкості дисоціації (k_2), також званої "швидкістю дисоціації k_{off} ", до швидкості асоціації (k_1) або "швидкості асоціації k_{on} ". Таким чином, величина K_D дорівнює k_2 / k_1 або k_{off} / k_{on} і виражається у вигляді молярної концентрації (М). Отже, чим менше значення K_D , тим сильніше зв'язування. Таким чином, K_D , рівний 10^{-6} М (або 1 мікроМ), вказує на більш слабе зв'язування, ніж при 10^{-9} М (або 1 нМ). Ці значення можна розрахувати з використанням поверхневого плазменого резонансу та / або методу Кінеха, як відомо в даній галузі техніки.

При використанні в цьому документі, терміни "моноклональних антитіл" або "композиція моноклональних антитіл" означають препарат молекул антитіла мономолекулярної композиції. Композиція моноклональних антитіл відображає одну специфічність зв'язування і афінність до конкретного епітопу. Цей термін також включає в себе "рекомбінантне антитіло" і "рекомбінантне моноклональних антитіл", оскільки всі антитіла отримують, експресують, створюють або виділяють з використанням рекомбінантних засобів, таких як (а) антитіла, виділені з тваринного або гібридомі, які отримують за допомогою злиття секретуючих антитіло клітин тварин з клітинами-партнерами злиття, (b) антитіла, виділені з клітини-господаря, трансформованому для експресії антитіла, наприклад, з трансфектоми, (c) антитіла, виділені з рекомбінантної, комбінаторної людської бібліотеки антитіл або бібліотеки антитіл іншого виду, а також (d) антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені якими іншими засобами, що включають сплайсинг генних послідовностей імуноглобуліну з іншими послідовностями ДНК. Передбачається, що при використанні в цьому документі "виділене антитіло" означає антитіло, по суті вільне від інших антитіл з різними характеристиками антигенної специфічності. Виділене антитіло, що специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом людського CD27, тим не менш, може мати перехресну реактивність з іншими спорідненими антигенами, наприклад, інших видів (наприклад, видових гомологів). Крім того, ізольоване антитіло може бути практично вільним від стороннього клітинного матеріалу і (або) хімічних речовин. В одному варіанті здійснення даного винаходу "виділені" моноклональні антитіла, що мають різні характеристики специфічності, комбінуються в композиції ретельно певного складу.

Використовуються в цьому документі терміни "специфічне зв'язування", "іммуноспецифічне зв'язування" і "зв'язується іммуноспецифічно" означають зв'язування антитіла з заданим антигеном. Як правило, зв'язування антитіла характеризується константою дисоціації (K_D) 10^{-7} М-менш. Зв'язування з наперед визначеним антигеном відбувається при K_D , в два рази меншою, ніж K_D зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїн, або будь-який інший поліпептид), відмінним від визначеного антигену. Фрази "антитіло, що розпізнає антиген" і "антитіло, специфічне до антигену" використовують в цьому документі на взаємно замінній основі з терміном "антитіло, що специфічно зв'язується з антигеном".

Використане в цьому документі словосполучення "високоспецифічні" зв'язування означає, що відносна K_D антитіла до конкретного епітопи-мішені щонайменше в 10 разів менше, ніж K_D зв'язування цього антитіла з іншими лігандами.

При використанні в цьому документі "ізотип" означає клас антитіл (наприклад, IgM або IgG), який кодується генами константного ділянки важкого ланцюга. Деякі класи антитіл додатково охоплюють підкласи, які також кодуються константними ділянками важкого ланцюга і додатково зв'язуються з олігосахаридами по конкретним залишкам в доменах константного ділянки (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4), що додатково задає біологічні функції антитіла. Наприклад, у людському антитілі ізотипи IgG1, IgG3 і меншою мірою IgG2 демонструють ефекторні функції, як і мишачі антитіла IgG2a.

Під "ефекторними" функціями і виразом "ефекторно позитивний" розуміється те, що антитіло містить домени, відмінні від специфічних антигензв'язуючих доменів, які можуть взаємодіяти з рецепторами або іншими компонентами крові, такими як система комплементу, що веде, наприклад, до залучення макрофагів і подіям, провідним до руйнування клітин, пов'язаних з антигензв'язуючих доменами антитіла. Антитіла володіють декількома ефекторними функціями, опосередкованими зв'язуванням з ефекторними молекулами. Наприклад, зв'язування компонента C1 комплементу з антитілами активує систему комплементу. Активація системи комплементу важлива для опсонізації і лізису клітинних патогенів. Активація системи комплементу стимулює запальний відповідь і також може бути залучена в розвиток аутоімунної гіперчутливості. Додатково антитіла зв'язуються з клітинами за допомогою Fc-ділянки, причому сайт Fc-рецептора на Fc-ділянці антитіла зв'язується з Fc-рецептором (FcR) на клітині. Існує безліч Fc-рецепторів, специфічних для різних класів антитіл, включаючи IgG (гамма-рецептори), IgE (ця-рецептори), IgA (альфа-рецептори) і IgM (мю-рецептори). Зв'язування антитіла з Fc-рецепторами на поверхнях клітин ініціює безліч важливих різноманітних біологічних реакцій, включаючи поглинання і деструкцію покритих антитілами частинок, виведення імунних комплексів, лізис покритих антитілами клітин-мішеней клітинами-кілерами (це називається антителозависимою клітинноопосередованою цитотоксичністю, або ADCC), вивільнення медіаторів запалення, проходження через плаценту і контроль продукції імуноглобулінів.

1. Склад антитіла згідно з винаходом

CD27-нейтралізуюче антитіло згідно з винаходом являє собою антитіло, яке пригнічує, блокує або перешкоджає щонайменше одній активності CD27 або зв'язуванню з CD70 *in vitro*, *in situ* і / або *in vivo* і не сприяє, не стимулює, чи не індукуює або не виступає в ролі агоніста активності CD27 або зв'язування ліганда і не імітує зв'язування антитіла по низхідному ефекту CD27-ліганд лігування, зокрема взаємодії CD70 з CD27, як сигнальної трансдукції в клітині-господарі. Відповідне CD27-нейтралізуючі антитіло, певна частина, або варіант може також в залежності від обставин впливати щонайменше на одну активність або функцію CD27, які включають, крім іншого, наступне: синтез РНК, ДНК чи білка, вивільнення білка, активація Т-клітин, проліферація або диференціація В-клітин, секреція антитіла, сигналізування рецептора CD27, деградація CD27, зв'язування з лігандом CD27, індукція CD27 або CD70, синтез або секреція.

Лікування аутоімунних захворювань з підвищеними ефекторними функціями Т-або В-клітин може бути корисним щодо костимулюючої блокуючої активності шляху CD27:CD70 CD27-нейтралізуючих антитіл даного винаходу.

Цей винахід заснований на відкритті анти-людських CD27 моноклональних антитіл, що здатні інгібувати активацію CD27 лігандом CD70 і не здатні до самоактивації у відсутності стимулятора CD70. Були отримані гібридами і трансфектоми, здатні секретувати такі антитіла. Застосовувався аналіз репортерного гена NF- κ B для визначення кількох потенційних антитіл, здатних інгібувати CD70-опосередковану активацію гена-репортера NF- κ B клітин-господарів, що експресують CD27. По-друге, антитіла були охарактеризовані як нездатні індукувати дозозалежну агоністичну активність при інкубації з CD27 в поєднанні з клітинами, трансфектованими репортером люциферази при відсутності стимулятора CD70. По-третє, було показано, що антитіла в залежності від дози інгібують CD70-залежну проліферацію людських наївних CD4 Т-клітин. По-четверте, отримані CD27-нейтралізуючі антитіла здатні зменшувати CD70-опосередковану стимуляцію генерації плазматичних клітин з людських первинних В-клітин в залежності від дози. По-п'яте, при дослідженні антитіл до CD27 не спостерігалася значна дозозалежна агоністична активність в первинних Т-або В-клітинах.

Антитіла за винаходом можуть перешкоджати лігуванню CD27:CD70, інгібувати як ефекторні функції Т-клітин, так і диференціацію В-клітин в плазматичні клітини в культурі клітин і, таким чином, можуть бути корисними для лікування іммуноопосередованих захворювань, що

включають, але не обмежуються наступними: ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, розсіяний склероз, запальне захворювання кишечника, хвороба Крона, хронічна обструктивна хвороба легень або інший синдром, патологія, захворювання або розлад, пов'язані з аберантними функціями або активацією клітинних популяцій, що експресують CD27.

5 CD27-зв'язуючі антитіла, що описані в даному документі, розпізнають щонайменше три окремих ділянки на позаклітинному домені людського CD27, вказуючи на додаткове відкриття декількох місць на CD27, що підходять для націлювання антитіл або інших сполук з можливостями блокування аналогічної функції. Таким чином, експресія та очищення антитіл зв'язуючих доменів, представлених в даному документі в якості амінокислотних послідовностей, додатково
10 пропонує інструмент, який може бути засобом для відбору нових молекул, що проявляють CD27-нейтралізуючу активність.

В одному варіанті здійснення даного винаходу, антилюдське CD27 антитіло має ділянку зв'язування, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) або варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), що має амінокислотну послідовність, як показано в Пор. ід. №: 76-144 і
15 антитіло або зв'язуюча частина якого імуноспецифічно зв'язується з CD27. В іншому варіанті здійснення даного винаходу, антитіло або його частина, що зв'язує антиген, зв'язується з білком CD27 і, крім того, антитіла володіють зазначеними функціональними властивостями антитіл винаходу, наприклад:

зв'язування з іммобілізованим людським CD27;
20 інгібування людського розчинного зв'язування CD27 з клітинами, що експресують CD70;
інгібування людського CD70, що опосередкує сигналізування CD27, виміряне в результаті аналізу репортерного гена NF-карраВ на рівні IC50 менше 0,5 мкг / мл;
інгібування CD70-опосередкованої проліферації наївних Т-клітин;
інгібування CD70-опосередкованого утворення бластних клітин плазми з первинних В-клітин
25 людини;

інгібування людського CD70-опосередкованого вивільнення розчинного медіатора з первинних клітин або клітинних ліній Т і В;

зв'язування з людським CD27 з K_d менше ніж 100 нМ (10^{-7} М);

мінімальна активація сигналізування CD27 при відсутності стимулятора CD70; і

30 зв'язування з епітопом на людському позаклітинному домені CD27, з яким пов'язуються моноклональні антитіла, що мають одну або декілька послідовностей варіабельних ділянок з Пор. ід. №: 76-144 і конкурують за зв'язування з моноклональними антитілами, що мають одну або кілька послідовностей варіабельних ділянок з Пор. ід. №: 76-144.

Оскільки в даній області техніки добре відомо, що CDR домени важкого і легкого ланцюгів антитіл відіграють особливо важливу роль в специфічності/афінності прив'язки антитіла до антигену; рекомбінантні антитіла за винаходом, що описується тут, переважно містять один або декілька CDR важкого і легкого ланцюга з Пор. ід. №: 1-75. Такі антитіла можна отримати шляхом хімічної сполуки різних частин (наприклад, CDR, каркасна ділянка) антитіла з використанням звичайних методів, шляхом підготовки та експресії (однієї або декількох)
40 молекул нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло, з використанням звичайних методів технології рекомбінантної ДНК або будь-яким іншим відповідним методом.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, людські антитіла за винаходом мають послідовність з одного або декількох CDR важкого і легкого ланцюга Пор. ід. №: 1-75. На додаток до цих послідовностей CDR, спеціалісту в даній області буде зрозуміло, що можливі
45 або бажані деякі відхилення від точних послідовностей CDR при збереженні здатності до зв'язування антитіла з CD27 (наприклад, консервативні заміни). Відповідно, в іншому варіанті здійснення даного винаходу, людське антитіло може складатися з одного або декількох CDR, що, наприклад, на 90 %, 95 %, 98 % або 99,5 % ідентичні з CDR, перерахованим в Пор. ід. №: 1-75.

50 В іншому варіанті здійснення даного винаходу, епітоп, пов'язаний з антитілами за винаходом, що містить всього лише п'ять з усіх залишків 21-191 білка CD27 або його послідовність, що кодує нуклеїнову кислоту, можна використовувати для імунізації пацієнта з метою вироблення антитіл винаходу безпосередньо в носіїві з метою лікування, профілактики, або полегшення захворювання або симптомів захворювання, пов'язаного з виробленням CD27.

55 2. Генерація CD27-нейтралізуючих антитіл

CD27-нейтралізуюче антитіло проявляє бажаний спектр біоактивності, як наведено в якості прикладу в даному документі, в якості розкритих і описаних антитіл, може отримуватися з використанням різних методик, в тому числі і методу стандартної гібридизації соматичних клітин (метод гібридоми) згідно з Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495. При отриманні гібридоми,
60 мишу або іншу відповідну тварину, наприклад, хом'ячка або макаку, імунізують описаним у

цьому документі способом, щоб виділити лімфоцити, що виробляють або здатні виробляти антитіла, що специфічно зв'язуються з білками, використовуваними для імунізації. Альтернативно, лімфоцити можна імунізувати *in vitro*. Потім проводять злиття лімфоцитів з клітинами мієломи з використанням відповідного агента для злиття, такого як поліетиленгліколь, для утворення клітини гібридоми (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

CD27-нейтралізуюче антитіло також можна додатково генерувати шляхом імунізації трансгенних тварин (наприклад, мишей, щурів, хом'яків, нелюдиноподібних приматів, тощо), здатних продукувати спектр людських антитіл, як описано тут і / або як відомо в даній галузі техніки. Клітини, які продукують людські антитіла до CD27, можна виділити з організму таких тварин і за допомогою відповідних методів зробити безсмертними за допомогою методів, що вказані в даному документі. В іншому випадку, послідовності, що кодують антитіло, можна клонувати, ввести у відповідний вектор і використовувати для трансфекції клітини-господаря, щоб експресувати і виділити антитіла описаними в цьому документі методами та іншими методами, відомими фахівцям у даній галузі.

За допомогою трансгенних мишей, що несуть в зародкових клітинах локус людського імуноглобуліну (Ig), можна отримати високоафінні повністю людські моноклональні антитіла до ряду мішеней, у тому числі до людських аутоантигенів, до яких нормальна людська імунна система толерантна (Lonberg, N. et al., US5569825, US6300129 and 1994, *Nature* 368:856-9; Green, L. et al., 1994, *Nature Genet.* 7:13-21; Green, L. & Jakobovits, 1998, *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg, N and Huszar, D., 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Kucherlapati, et al. US6713610; Bruggemann, M. et al., 1991, *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326; Fishwild, D. et al., 1996, *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez, M. et al., 1997, *Nat. Genet.* 15:146-156; Green, L., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X. et al., 1999, *Cancer Res.* 59:1236-1243; Bruggemann, M. and Taussig, M J., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458, 1997; Tomizuka et al. WO02043478). Ендогенний локус імуноглобуліну у таких мишей можна зруйнувати або піддати делеції, щоб таким чином позбавити тварину здатності утворювати антитіла, які кодуються ендогенними генами. Крім того, людські антитіла до обраних антигенів можна замовити в компаніях, наприклад, в Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) або Medarex (San Jose, Calif.), які виготовлять їх за допомогою методів, описаних вище.

У варіанті здійснення даного винаходу людське антитіло вибрали з фагової бібліотеки, де фаг містив гени людського імуноглобуліну, що експресує зв'язуючі домени людського антитіла, наприклад, одноланцюгових антитіл (scFv) типу або інших конструктів зі спареними або неспареними варіабельними ділянками (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets et al. *PITAS (USA)* 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Людські моноклональні антитіла за даним винаходом можна приготувати з використанням методів фагового дисплея для скринінгу бібліотек генів людських імуноглобулінів. Таке застосування методу фагового дисплея для виділення людських антитіл добре відомо в даній області. Див., наприклад патенти США: в патентах США №№ 5,223,409; 5,403,484; і 5,571,698 до Ladner et al.; патенти США №№ 5,427,908 і 5, 580,717 до Dower et al.; патенти США №№ 5,969,108 і 6,172,197 до McCafferty et al.; патенти США №№ 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 і 6,593,081 до Griffiths et al.

Отримання імуногенних антигенів і моноклональних антитіл можна здійснити з використанням будь-якої зручної технології, такий як вироблення рекомбінантного білка. Імуногенні антигени можна вводити в організм тварини у вигляді очищеного білка або сумішей білків, у тому числі цілих клітин або клітинних або тканинних екстрактів або антиген можна створити *de novo* в тілі тварини з нуклеїнових кислот, що кодують вказаний антиген або його частину.

Як добре відомо фахівцям, виділені нуклеїнові кислоти, що становлять предмет цього винаходу, можуть бути отримані з використанням (а) рекомбінантних способів, (b) синтетичних способів, (c) способів очищення або їх поєднань. ДНК, що кодує моноклональні антитіла, легко виділяють і секвенують з використанням методів, відомих у даній галузі (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, що здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі і легкі ланцюги мишачих антитіл). При створенні гібридом, такі клітини можуть служити джерелом такої ДНК. В альтернативному випадку, при використанні методу дисплея зі злиттям кодуючої послідовності і продукту трансляції (наприклад, фагових або рибосомальних бібліотек), селекція сполучної ланки і нуклеїнової кислоти спрощена. Після фагової селекції ділянки фага, що кодують антитіло, можна ізолювати і використовувати для синтезу цілих антитіл, включаючи людські, або будь-яких інших бажаних антигензв'язуючих фрагментів, і

експресувати в будь-якому бажаному господарі, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі і бактерії.

Гуманізовані антитіла

Крім того, винахід пропонує гуманізовані (сконструйовані або адаптовані до людини) імуноглобуліни (або антитіла), що зв'язуються з людським CD27. Гуманізовані форми імуноглобулінів мають варіабельні каркасні ділянки, в основному з людського імуноглобуліну (званого акцепторним імуноглобуліном) і CDR, в основному з нелюдського моноклонального антитіла, що специфічно зв'язується з CD27. Константна ділянка (ділянки), при наявності, також, по суті, походить від людського імуноглобуліну. Гуманізовані антитіла показують K_D для CD27, що дорівнює щонайменше приблизно 10^{-6} М (1 мікро), приблизно 10^{-7} М (100 нМ) або нижче. Афінність зв'язування гуманізованих антитіл може бути більше або менше, ніж така у антитіл миші, з яких вони були отримані. Для забезпечення зміни афінності, наприклад, для підвищення афінності гуманізованого антитіла до CD27, можуть бути зроблені заміни або в залишках CDR, або в людських залишках.

Заміщення мишачих CDR на варіабельну каркасну ділянку домену людини, швидше за все, призведе до утримання їхньої правильної орієнтації в просторі, якщо варіабельна каркасна ділянка домену людини адаптує таку ж або аналогічну конформацію до мишачої варіабельної каркасної ділянки, з якої походить CDR. Це досягається за рахунок отримання людських варіабельних доменів антитіл людини, каркасні послідовності яких виявляють високу ступінь ідентичності послідовності з мишачими варіабельними доменами каркасних ділянок, з яких походять CDR. Варіабельні ділянки каркасу важкого і легкого ланцюгів можуть походити від тих же або інших послідовностей людського антитіла. Послідовності людського антитіла можуть являти собою послідовності людських антитіл природного походження, можуть бути отримані з послідовностей людського імуноглобуліну зародкової лінії або можуть бути загальними типовими послідовностями з декількох людських антитіл і / або послідовностей зародкової лінії.

Відповідні послідовності людського антитіла визначають шляхом комп'ютерного порівняння амінокислотних послідовностей мишачих варіабельних ділянок з послідовностями відомих людських антитіл. Порівняння проводиться окремо для важкого та легкого ланцюгів, але принципи в обох випадках аналогічні.

В одному прикладі, амінокислотна послідовність CD27-нейтралізуючого моноклонального антитіла використовується для запиту в базу даних людських антитіл, що складена з загальнодоступних баз даних послідовностей антитіл. Варіабельні ділянки важкого ланцюга, розкриті або описані тут, можна використовувати для пошуку людської варіабельної ділянки з найвищою ідентичністю послідовностей. Варіабельну ділянку легкого ланцюга, розкриту або описану тут, також можна використовувати для пошуку людської варіабельної ділянки з найвищою ідентичністю послідовностей. ДНК-конструкцію, в якій ділянки, що кодують CDR однієї з варіабельних ділянок важкого ланцюга донора мишачого моноклонального антитіла, переміщують в обрану варіабельну послідовність людського важкого ланцюга, замінюючи CDR людської варіабельної ділянки, отримують для кожної мишачої варіабельної ділянки.

Неприродне сусідство мишачих ділянок CDR з людським варіабельними каркасними ділянками може призводити до неприродних конформаційних обмежень, що, якщо їх не скорегувати за допомогою заміщення деяких амінокислотних залишків, можуть призвести до втрати афінності зв'язування. Як зазначалося вище, гуманізовані антитіла згідно з винаходом містять варіабельну каркасну ділянку, в основному з людського імуноглобуліну, та CDR, в основному з мишачого імуноглобуліну (наприклад, мишачі антитіла C2177, C2186, C2191 або C2192). Після визначення CDR мишачих антитіл і відповідних послідовностей акцепторного імуноглобуліну людини, наступним кроком є визначення, які (якщо такі є) залишки цих компонентів слід замінити, щоб оптимізувати властивості отриманого гуманізованого антитіла. В цілому, заміна амінокислотних залишків людини мишачими повинна бути зкорочена до мінімуму, оскільки введення мишачих залишків збільшує ризик того, що антитіло може викликати НАМА-відповідь в організмі людини. Амінокислоти для заміщення вибирають на основі їх можливого впливу на конформацію CDR і / або зв'язування з антигеном. Дослідження такого можливого впливу можна провести шляхом моделювання, дослідження характеристик амінокислот у конкретних позиціях або емпіричного спостереження ефектів заміщення або мутагенезу конкретних амінокислот. Емпіричним способом було виявлено, що особливо зручно створити бібліотеку варіантів послідовностей, які можна перевіряти на необхідну активність, афінність зв'язування або специфічність. Одним форматом створення такої бібліотеки варіантів є вектор фагового дисплея. В альтернативному варіанті здійснення, варіанти можуть бути отримані з використанням інших способів зміни положення нуклеотидної послідовності, що кодує цільові залишки в варіабельному домені.

Інший спосіб визначення необхідності в додаткових замінах і вибір амінокислотних залишків для заміни може бути реалізований з використанням комп'ютерного моделювання. Широко доступне комп'ютерне апаратне і програмне забезпечення для отримання тривимірних зображень молекул імуноглобуліну. Як правило, молекулярні моделі отримують, починаючи з розрахованих структур імуноглобулінових ланцюгів або їх доменів. Моделювані ланцюги порівнюють за подібністю амінокислотної послідовності з ланцюгами або доменами з розрахованими тривимірними структурами, і ланцюги або домени, які мають найбільшу схожість послідовності, відбирають в якості вихідних точок для побудови молекулярної моделі. Розраховані тривимірні структури модифікують, щоб врахувати відмінності між фактичними амінокислотами імуноглобулінових ланцюгів або модельованими доменами, а також відмінності у вихідній структурі. Потім модифіковані структури збирають в складовий імуноглобулін. Нарешті, модель уточнюють шляхом мінімізації енергії та перевірки того, що всі атоми перебувають на відповідних відстанях один від одного, а довжини і кути зв'язку знаходяться в допустимих з хімічної точки зору межах.

Зазвичай ділянки CDR в гуманізованих антитілах є в основному ідентичними і найчастіш ідентичні відповідним ділянках CDR в мишачому антитілі, з якого вони були отримані. Хоча це небажано, іноді є можливість зробити одну або декілька консервативних амінокислотних заміни залишків CDR без помітного впливу на афінність зв'язування отриманого гуманізованого імуноглобуліну. Іноді заміни ділянок CDR можуть підвищити афінність зв'язування.

На відміну від специфічних амінокислотних заміни, що розглянуті вище, каркасні ділянки гуманізованих імуноглобулінів, зазвичай, в основному ідентичні і найчастіше ідентичні каркасним ділянкам людських антитіл, з яких вони були отримані. Зрозуміло, багато які з амінокислот в каркасних ділянках вносять мінімальний внесок або не вносять ніякого внеску в специфічність або афінність антитіла. Таким чином, багато які з окремих консервативних заміни амінокислотних залишків каркасної ділянки практично не відбиваються на специфічності або афінності отриманого гуманізованого імуноглобуліну.

Так як код є виродженим, амінокислотну послідовність кожного імуноглобуліну будуть кодувати різні нуклеотидні послідовності. Необхідну нуклеотидну послідовність можна отримати твердофазним синтезом ДНК *de nova* або за допомогою ПЛР-мутагенезу раніше отриманого варіанту необхідного полинуклеотида. Всі нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, описані в цій заявці, явним чином включені в даний винахід.

Варіабельні сегменти гуманізованих антитіл, сконструйованих вищеописаним способом, звичайно з'єднані як мінімум з частиною константної області людського імуноглобуліну. У складі антитіла будуть константні ділянки і легкого, і важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга зазвичай містить домени CH1, шарнірний, CH2, CH3 і іноді CH4.

Гуманізовані антитіла можуть містити константні домени будь-якого типу з будь-якого класу антитіл, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, а також будь-якого підкласу (ізотипу), включаючи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Коли потрібно, щоб гуманізоване антитіло показувало цитотоксичну активність, константний домен, як правило, являє собою комплементзв'язуючий константний домен, а клас, як правило, являє собою IgG₁. Коли така цитотоксическая активність небажана, в якості константного домену можна використовувати IgG₂. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більш ніж одного класу або ізотипу.

У вектори експресії вставляють нуклеїнові кислоти, що кодують гуманізовані варіабельні ділянки легкого та важкого ланцюгів, необов'язково з'єднані з константними ділянками. Легкий і важкий ланцюги можна клонувати в одному або в різних векторах експресії. ДНК-сегменти, що кодують імуноглобулінові ланцюги, функціонально з'єднують у векторі (векторах) експресії з контрольними послідовностями, що забезпечують експресію імуноглобулінових поліпептидів. Такі контрольні послідовності включають сигнальну послідовність, промотор, енхансер і послідовність термінатора транскрипції (див. Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989); WO 90/07861, Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992), які включені у всій повноті в справжній документ за допомогою посилання).

Ефективність терапевтичного білку може бути обмежена небажаними імунними реакціями. Нелюдські моноклональні антитіла можуть мати значні протяжності лінійних амінокислотних послідовностей і локальні структурні конформації, здатні викликати у людини імунну відповідь. Першою спробою знизити імуногенність нелюдських антитіл було створення химер людсько-мишачих антитіл, за яким послідувала розробка методів гуманізації цих химер в кінці 1980-х рр. (рев'. у Almagro and Fransson, Front Biosci 13: 1619-1633, 2008).

Одним з найбільш часто використовуваних підходів гуманізації є так звана "трансплантація ділянок, що визначають компліментарність (CDR)", в якому мишачі CDR трансплантують на каркасні ділянки (FR) людського антитіла. Проте, застосування цього методу частіше

призводить, ніж не приводить до істотної втрати зв'язування з антигеном і, отже, зниження імунотенного потенціалу препарату, виготовленого на основі антитіл. Отже, вкрай важливо використовувати чіткі принципи створення молекул антитіла, що проявляє мінімальні імунотенні реакції і при цьому зберігає зв'язуючі і біофізичні властивості материнської нелюдської молекули при введенні людині.

Описана гуманізація 2177 і 2191 двох мишачі моноклональних антитіл (mAb) зі специфічністю зв'язування з CD27. Каркасні ділянки (FR) цих антитіл були замінені на каркасні ділянки людського гена зародкової лінії з використанням першого кроку власної технології гуманізації Janssen під назвою Адаптація людської каркасної ділянки (HFA), розкритої в заявці на патент Raghunathan, G., US20090118127 A1 і далі наведеної в якості прикладу в публікації Fransson et al (J Mol Biol 398:214-231, 2010). Дана технологія забезпечує набір моноклональних антитіл, специфічних для CD27 з покращеними властивостями зв'язування та інгібування до тих, що виміряні для батьківських мишачих антитіл 2177 і 2191.

3. Способи застосування антитіла анти-CD27

Як докладно описано нижче, даний винахід демонструє, що чотири виділені моноклональні антитіла (C2177, C2186, C2191 і C2192) зв'язуються з трьома епітопами, що не перекриваються на CD27 і відображають дію, що інгібує CD27 *in vitro* та / або *in vivo*. Важливо відзначити, що реакційна здатність моноклональних антитіл включає в себе здатність блокувати взаємодію CD27 з CD70 в залежності від дози, знижувати сигналізацію CD27 в присутності CD70, зменшувати вироблення IL-4 і IFN γ Т-клітинами і пригнічувати CD70-залежну проліферацію людських наївних CD4 + Т-клітин, CD70-залежну проліферацію В-клітин і генерацію плазматичних клітин. Крім того, окремі антитіла істотно не індують активацію CD27 при відсутності стимулятора CD70.

З урахуванням властивостей моноклональних антитіл, як описано в даному винаході, антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти підходять в якості терапевтичних та профілактичних засобів для лікування або профілактики CD27-асоційованих станів в організмі людини і тварин.

Загалом, застосування буде включати в себе введення терапевтично або профілактично ефективного кількості одного або декількох моноклональних антитіл або антигензв'язуючих фрагментів з даного винаходу або обраних антитіл або молекул з аналогічним спектром зв'язування та біологічної активності, сприйнятливому пацієнту, або тому, у якого проявляється стан, в якому активність CD27, як відомо, має патологічні ускладнення, наприклад, імунотенне захворювання або зростання пухлини і метастази. Вводити можна будь-яку активну форму антитіла, у тому числі фрагменти Fab і F (ab')₂.

Переважно необхідно використовувати антитіла, сумісні з видом реципієнта, щоб дія MAb не було надто короткою або НЕ індукувала у суб'єкта імунну відповідь на MAb. Введені моноклональні антитіла можуть демонструвати деякі допоміжні функції, такі як зв'язування з Fc-рецепторами пацієнта і активація механізмів ADCC, для того, щоб виснажити популяцію клітин-мішеней з використанням цитолітичних або цитотоксичних механізмів, або вони можуть бути сконструйовані з обмеженням або позбавленням від цих вторинних ефекторних функцій з метою збереження популяції клітин-мішеней.

Лікування індивідуумів може полягати у введенні терапевтично ефективного кількості антитіл цього винаходу. Антитіла можуть бути у складі набору, описаного нижче. Антитіла можна використовувати або вводити у вигляді сумішей, наприклад, в рівних кількостях, або окремо, у певній послідовності, або вводити всі одночасно. При призначенні пацієнтові антитіл або їх фрагментів, здатних зв'язуватися з CD27, або антитіла, що забезпечує захист від CD27, потрібна корекція дози лікарського засобу в залежності від таких факторів, як вік пацієнта, вага, зріст, стать, загальний стан, попередній анамнез і т.д.

Схожою методикою іншим способом терапевтичного застосування моноклонального антитіла винаходу може бути активна імунізація пацієнта антиідіотипічним антитілом до одного з показаних моноклональних антитіл. Імунізація антиідіотипом, який імітує структуру епітопу, може викликати активну відповідь анти-CD27 (Linthicum, DS and Farid, NR, Anti-idiotypes, Receptors, and Molecular Mimicry (1988), pp 1-5 and 285-300).

Більш того, активну імунізацію можна індукувати, включивши до складу вакцини один і більше антигенних і (або) імунотенних епітопів. Вакцинацію в цілях профілактики або терапії можна проводити орально або парентерально, в кількості, достатньої для генерації реципієнтом захисних антитіл до цих біологічно активних ділянок. Господаря можна активно імунізувати антигенними / імунотенним пептидом в чистому вигляді, фрагментом цього пептиду, або модифікованою формою пептиду. До N-або C-кінця оригінального пептиду або його частини можна додати одну і більше амінокислот, відсутніх в оригінальній послідовності білка. Такі додаткові амінокислоти зазвичай включають для забезпечення взаємодії пептиду з іншим

пептидом, з білком-носієм або з підкладкою. Амінокислоти, які є корисними для цих цілей, включають: тирозин, лізин, глутамінову кислоту, аспарагінову кислоту, цистеїн та їх похідні. Можна використовувати альтернативні методи модифікації білка, наприклад, NH₂-ацетилювання або COOH-кінцеве амідування, щоб забезпечити додаткові можливості для з'єднання або злиття пептиду з іншою молекулою білка або пептиду, або з підкладкою.

Антитіла, здатні захищати від небажаної біоактивності CD27, пацієнти повинні отримувати в кількості, достатній для того, щоб зменшувати, лікувати, полегшувати пов'язані з CD27 симптоми або патології. Якщо при даному дозуванні, способі введення і графіку прийому лікарського засобу можливо добитися полегшення симптомів, то кількість лікарського засобу можна вважати достатньою або "терапевтично ефективною кількістю". Реакції у відповідь на введення антитіла можна виміряти, аналізуючи тканини, органи або клітини суб'єкта методами візуалізації або отримуючи зразки тканин і вивчаючи їх ex vivo. Речовина вважається фізіологічно значущою, якщо її присутність викликає здатні до виявлення зміни фізіології реципієнта.

Терапевтичні застосування

CD27-нейтралізуючі антитіла за даним винаходом, антигензв'язуючі фрагменти або їх зазначені варіанти можна використовувати для вимірювання або виклику дії в клітині, тканині, органі або тварині (включаючи ссавців і людей), для діагностики, моніторингу, модулювання, лікування, полегшення, допомоги у запобіганні захворюваності, або зменшенні симптомів, такого стану, що опосередкований, залежний від або модульований CD27 або клітинами, що експресують CD27. Таким чином, предметом даного винаходу є також метод послаблення або лікування щонайменше одного пов'язаного з CD27 захворювання за допомогою щонайменше одного антитіла CD27 цього винаходу в клітині, тканині, органі, організмі тварини або пацієнта, як відомо фахівцям в даній області або розкрито в цьому документі. особливі вказівки будуть розглянуті нижче.

Імунологічні захворювання

Предметом цього винаходу є також метод послаблення або лікування пов'язаних з імунітетом захворювань в клітині, тканині, органі, організмі тварини або пацієнта, в числі яких, серед інших: ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит з системним початком, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, виразка шлунка, серонегативні артропатії, остеоартрит, запальне захворювання кишечника, виразковий коліт, системний червоний вовчак, антифосфоліпідний синдром, іридоцикліт / увеїт / ретробульбарний неврит, ідіопатичний пневмосклероз, системний васкуліт / гранулематоз Вегенера, саркоїдоз, орхіт / процедури реверсивної вазектомії, алергічні / atopічні захворювання, астма, алергічний риніт, atopічний дерматит (екзема), езофагіт, алергічний контактний дерматит, алергічний кон'юнктивіт, гіперчутливий пневмоніт, трансплантати, відторгнення пересадженого органа, реакція "трансплантат проти хазяїна", синдром системної запальної реакції, синдром сепсису, грампозитивний сепсис, грамотришавний сепсис, негативний сепсис культури, грибовий сепсис, нейтропенічна лихоманка, уросепсис, менінгококкемія, травма / кровотеча, опіки, опромінення іонізуючим випромінюванням, гострий панкреатит, респіраторний дистрес-синдром дорослих, ревматоїдний артрит, спровокований алкоголем гепатит, хронічні запальні патології, хвороба Крона, серповидноклітинна анемія, цукровий діабет, нефроз, інші atopічні захворювання, реакції гіперчутливості, алергічний риніт, поліноз, хронічний алергічний риніт, кон'юнктивіт, ендометріоз, астма, кропив'янка, загальна анафілактична реакція, дерматит, перніціозна анемія, гемолітичні хвороби, тромбоцитопенія, відторгнення трансплантата будь-якого органу або тканини, відторгнення пересадженої нирки, відторгнення пересадженого серця, відторгнення пересадженої печінки, відторгнення пересадженої підшлункової залози, відторгнення пересадженого легкого, відторгнення пересадженого кісткового мозку (ВМТ), відторгнення шкірних алотрансплантатів, відторгнення пересадженого хряща, відторгнення пересадженої кістки, відторгнення пересадженої тонкої кишки, відторгнення пересадженого ембріонального тимуса, відторгнення пересадженої паразитоподібної залози, відторгнення ксенотрансплантата будь-якого органу або тканини, відторгнення алотрансплантату, антирецепторні реакції гіперчутливості, базедова хвороба, хвороба Рейно, інсулінорезистентність діабет В-типу, астма, міастенія гравіс, опосередкована антитілами цитотоксичність, реакції гіперчутливості III типу, системний червоний вовчак, РОEMS-синдром (полінейропатія, органомегалія, ендокринопатія, моноклональна гаммопатія і шкірні зміни), антифосфоліпідний синдром, пухирчатка, склеродермія, змішане ураження сполучної тканини, ідіопатична хвороба Аддісона, цукровий діабет, хронічний активний гепатит, первинний біліарний цирроз, вітіліго, васкуліт, посткардіотомний синдром, гіперчутливість IV типу, контактний дерматит, гіперчутливий пневмоніт, відторгнення алотрансплантату, гранульома,

спричинена внутрішньоклітинними організмами, метаболічна або ідіопатична чутливість до ліків, хвороба Вільсона, гемохроматоз, альфа-1-, антитрипсинова недостатність, діабетична ретинопатія, тиреоїдит Хашимото, остеопороз, порушення функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі, первинний біліарний цироз, тиреоїдит, енцефаломієліт, виснаження, муковісцидоз, хронічне захворювання легень новонароджених, хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ), спадковий гемофагоцитарний лімфогістіоцитоз, дерматологічні стану, псоріаз, алопеція, нефротичний синдром, нефрит, гломерулярний нефрит, гостра ниркова недостатність, гемодіаліз, уремія, токсичність, прееклампсія і запалення внаслідок анти-CD3 терапії, терапії ОКТ3, цитокінами, хіміотерапії, променевої терапії (наприклад, включаючи, крім іншого, наступне: астенії, анемії, кахексії і подібних захворювань), хронічну інтоксикацію салицилатом.

Захворювання легень

Цей винахід також пропонує спосіб модуляції або лікування захворювання легень або плеври в клітині, тканині, органі, організмі тварини або пацієнта, включаючи, крім іншого, наступне: модуляція імунної відповіді на асоційовані або допоміжні клітини або клітинні процеси з залученням CD27, наприклад, пневмонія; абсцес легень; професійні захворювання легень, викликані агентами у формі пилу, газу або аерозолів; астма, фіброзно-облітеруючий бронхіоліт, дихальна недостатність, алергічні захворювання легень, включаючи алергічний пневмоніт (екзогенний алергічний альвеоліт), алергічний бронхолегеневий аспергільоз та медикаментозна алергія; респіраторний дистрес-синдром у дорослих (ARDS), синдром Гудпасчера, хронічні обструктивні хвороби легень (ХОХЛ), ідіопатичні інтерстиціальні захворювання легень, такі як ідіопатичний легеневий фіброз, саркоїдоз, десквамативна інтерстиціальна пневмонія, гостра інтерстиціальна пневмонія, інтерстиціальна хвороба легень, асоційована з респіраторним бронхіолітом, ідіопатичний облітеруючий бронхіоліт з пневмонією, лімфоцитарний інтерстиційний пневмоніт, гранулематоз з клітин Лангерганса, ідіопатичний легеневий гемосидероз; гострий бронхіт, легеневий альвеолярний протеїноз, бронхоектаз, захворювання плеври, ателектаз, кістозний фіброз і пухлини легень, а також легенева емболія.

Злоякісні захворювання

Цей винахід також пропонує спосіб модуляції або лікування злоякісного захворювання в клітині, тканині, органі, організмі тварини або пацієнта, включаючи, крім іншого, наступне: модуляція імунної відповіді на асоційовані або допоміжні клітини або клітинні процеси з залученням CD27, щонайменше, одного з наступних: лейкоз, гострий лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз, В-лімфобластний, або Т-лімфобластний, або FAV ГЛЛ, гострий меліелоїдний лейкоз (ГМЛ), хронічний меліелоїдний лейкоз (ХМЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), волосатоклітинний лейкоз, мієлодиспластичний синдром (МДС), лімфома, хвороба Ходжкіна, злоякісна лімфома, неходжкінська лімфома, лімфома Беркитта, множинна мієлома, солідні пухлини в якості первинного або метастатичного захворювання, саркома Капоші, колоректальна карцинома, карцинома підшлункової залози, рак нирки, рак легень, включаючи мезотеліому, рак молочної залози, назофарингеальна карцинома, злоякісний гістіоцитоз, паранеопластичний синдром / гіперкальціємія, пов'язана зі злоякісним ростом, аденокарциноми, плоскоклітинні карциноми, саркоми, злоякісна меланома, особливо метастатична меланома, гемангіома, метастатична пухлина, пов'язана з раком резорбція кісткової тканини і пов'язана з раком біль в кістках і т.п.

Серцево-судинні захворювання

Цей винахід також відноситься до методу модулювання або лікування серцево-судинного захворювання в клітинах, тканинах, органах, у тварин або пацієнтів, включаючи, крім іншого, наступне: модулювання імунної відповіді асоційованим або допоміжним клітинам або клітинним процесам, що залучають CD27, щонайменше одного з наступного ряду захворювань: інфаркт міокарда, застійна серцева недостатність, інсульт, ішемічний інсульт, крововилив, артеріосклероз, атеросклероз, рестеноз, діабетичний артеріосклероз, гіпертонія, артеріальна гіпертензія, вазоренальна гіпертензія, непритомність, шок, сифіліс серцево-судинної системи, серцева недостатність, легеневе серце, первинна легенева гіпертензія, серцева аритмія, передсердна екстрасистола, тріпотіння передсердь, фібриляція передсердь (постійна або пароксизмальна), постперфузійний синдром, запалення на тлі штучного кровообігу, хаотична або мультифокальна передсердна тахікардія, регулярна тахікардія з вузькими QRS-комплексами, специфічні аритмії, фібриляція шлуночків, аритмії пучка Гіса, атріовентрикулярна блокада, блокада ніжки пучка Гіса, ішемічні порушення міокарда, ішемічна хвороба серця, стенокардія, інфаркт міокарда, кардіоміопатія, дилатаційна застійна кардіоміопатія, рестриктивна кардіоміопатія, вади серця, ендокардит, захворювання перикарда, серцеві пухлини, аневризми аорти і периферійних артерій, розшарування аорти, запалення аорти,

оклюзія черевної аорти та її гілок, периферичні судинні розлади, оклюзійні розлади артеріального кровообігу, атеросклеротичне захворювання периферичних артерій, облітеруючий тромбангіт, функціональні розлади периферичних артерій, явище і хвороба Рейно, акроціаноз, ерітромелалгія, венозні захворювання, венозний тромбоз, варикозні вени, артеріовенозна фістула, лімфедема, жировий набряк, нестабільна стенокардія, реперфузійне пошкодження, синдром поліорганної недостатності після штучного кровообігу, ішемічно-реперфузійне пошкодження і т. п.

Неврологічні захворювання

Цей винахід також пропонує спосіб модуляції або лікування неврологічного захворювання в клітині, тканині, органі, організмі тварини або пацієнта, включаючи, крім іншого, наступне: модуляцію імунної відповіді на асоційовані або допоміжні клітини або клітинні процеси з залученням CD27 в одному з наступних захворювань: нейродегенеративні захворювання, розсіяний склероз, мігрень, комплекс СНІД-деменція, демієлінізуючі захворювання, такі як розсіяний склероз і гострий поперечний мієліт; екстрапірамідні і мозочкові розлади, такі як поразки кортикоспінальної системи; розлади базальних гангліїв або мозочкові розлади; гіперкінетичні розлади руху, такі як хорея Гентінгтона чи стареча хорея рухові розлади, викликані прийомом лікарських препаратів, такі як індуковані лікарськими препаратами, які блокують дофамінові рецептори ЦНС; гипокінетичні рухові розлади, такі як хвороба Паркінсона; прогресуючий над'ядерний параліч; структурні ураження мозочка; спинномозкові і мозочкові дегенерації, такі як спинальні атаксії, атаксія Фридрейха, мозочкові коркові дегенерації, дегенерації кількох систем (синдром Менсел, Дежерина-Томаса, Шая-Драгера і Мачадо-Джозефа); системні порушення (хвороба Рефсума, абеталіпопротеїнемія, атаксія, телеангіектазія і мітохондріальний мультисистемний розлад); демієлінізуючі основні захворювання, такі як розсіяний склероз, гострий поперечний мієліт; і розлади рухової одиниці, такі як нейрогенні м'язові атрофії (клітинна дегенерація переднього рогу, така як бічний аміотрофічний склероз, спинальна м'язова атрофія у дітей і ювенільний спинальна м'язова атрофія); хвороба Альцгеймера; синдром Дауна; хвороба дифузних тілець Леві; стареча деменція, пов'язана з розвитком тілець Леві; синдром Верніке-Корсакова; хронічний алкоголізм; хвороба Крейтцфельда-Якоба; підгострий склерозуючий паненцефаліт, хвороба Галлервордена-Шпатца; а також деменція боксерів і т. п. Такий спосіб може необов'язково включати введення ефективною кількості композиції або фармацевтичної композиції, що містить щонайменше одне антитіло до TNF, вказану частину або варіант, в клітини, тканини, органи, тваринам або пацієнтам, яким потрібно такого роду модулювання, лікування або терапія.

Інші способи терапевтичного застосування CD27-нейтралізуючих антитіл

На додаток до описаних вище станів і захворювань, даний винахід також пропонує спосіб модуляції або лікування фіброзних станів різної етіології шляхом модуляції імунної відповіді на асоційовані або допоміжні клітини або клітинні процеси з залученням CD27, наприклад: фіброз печінки (включаючи, крім іншого, наступне: алкогольний цироз, вірусний цироз печінки, аутоімунний гепатит); фіброз легенів (включаючи, крім іншого, наступне: склеродермія, ідіопатичний фіброз легенів); фіброз нирок (включаючи, крім іншого, наступне: склеродермія, діабетичний нефрит, клубочковий нефрит, вовчаковий нефрит); фіброз шкіри (включаючи, крім іншого, наступне: склеродермія, гіпертрофічні та келоїдні рубці, опіки); мієлофіброз; нейрофіброматоз; фіброма; кишковий фіброз; і фіброзні спайки, що виникли в результаті хірургічних процедур.

Цей винахід також пропонує спосіб модуляції, лікування або полегшення симптомів інфекційного захворювання в клітині, тканині, органі, організмі тварини або пацієнта, шляхом модуляції імунної відповіді на асоційовані або допоміжні клітини або клітинні процеси з залученням CD27 в таких захворюваннях як, наприклад: гострі або хронічні бактеріальні інфекції, гострі або хронічні паразитарні або інфекційні процеси, включаючи бактеріальні, вірусні та грибові інфекції, ВІЛ-інфекцію / ВІЛ-нейропатію, менінгіт, гепатит (А, В, С або ін.), септичний артрит, перитоніт, пневмонію, запалення надгортанника, кишкову паличку, хворобу Гассера, малярію, геморагічну форму лихоманки денге, лейшманіоз, проказу, токсичний шок, стрептококовий міозит, газову гангрену, туберкульоз, комплекс *Mycobacterium avium*, пневмоцистну пневмонію, запальні захворювання органів таза, орхіт / епідидиміт, легіонеллу, хворобу Лайма, грип А, вірус Епштейна-Барр, гемофагоцитарний синдром, що загрожує життю, енцефаліт / вірусний менінгіт тощо.

Всі згадані роботи (у тому числі книги, патенти, опубліковані патентні заявки на патент і патентні заявки, що одночасно р) включені в текст даної заявки за допомогою посилання.

Інші властивості винаходу будуть описані нижче в прикладах втілень, наведених для ілюстрації винаходу і не обмежують його обсяг і сутність.

4. Фармацевтичні композиції

Даний винахід являє собою стабільні композиції CD27-нейтралізуючих антитіл, які переважно являють собою водний розчин на основі фосфатного буферного розчину або змішаного сольового розчину, а також розчини та композиції з консервантами, композиції з консервантами для багаторазового використання, які можна використовувати у фармацевтичних або ветеринарних цілях, що містять щонайменше одне CD27-нейтралізуюче антитіло в фармацевтично прийнятній композиції. Припустимі для цілей цього винаходу несучі середовища та їх композиція з можливістю введення інших білків людини, наприклад, сироватковий альбумін людини, описані, наприклад, в публікації Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^е вид., під ред. Troy, DB ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006 р, Частина 5.

Для створення фармацевтичної композиції, придатної для ефективного введення, такі композиції повинні містити ефективну кількість описаних вище сполук, разом з відповідною кількістю несучого середовища. Для контролю тривалості дії антитіл можна використовувати додаткові фармацевтичні методи. З використанням полімерів, що утворюють комплекси або абсорбуючих компонентів, можна готувати препарати з контрольованим вивільненням. Інший можливий метод контролю тривалості дії препаратів з контрольованим вивільненням – це включення компонентів цього винаходу в частинки полімерного матеріалу, наприклад, поліестеру, поліамінокислот, гідрогелів, (полі) молочної кислоти або сополімера етилену з вінілацетату. В альтернативному варіанті, замість включення агентів в полімерні частинки, можна упаковувати їх в мікрокапсули, виготовлені методом міжфазної полімеризації, наприклад, в мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатину або полі(метілметацілат)у, або використовувати антитіла в колоїдних системах доставки, наприклад, в ліпосомах, мікросферах з альбуміну, мікроемульсіях, наночастках і нанокapsулах або макроемульсії. Такі методи описані в публікації Remington, зазначеній вище (2006).

5. Введення CD27-нейтралізуючих антитіл

Щонайменше одне CD27-нейтралізуюче антитіло або в стабільній рецептурі, або з додаванням консервантів або розчинів що описані у цьому документі, можна вводити пацієнтові відповідно до цього винаходу за допомогою різних способів введення, наприклад, внутрішньовенно (в / в), внутрішньом'язово (в / м); підшкірно (п / ш); також є трансдермальний, легеневий, чрезнадшлунковий шляхи введення, з використанням композиції в імплантаті, осмотичному насосі, картриджі, мікронасосі або інших засобах, що визнані як фахівцями в даній області, так і відомими в даній галузі техніки.

В одному із способів введення CD27-нейтралізуючих антитіл, лікарська речовина вводиться внутрішньовенно через раніше встановлений катетер, забезпечений інфузійним мішком. CD27-нейтралізуюче антитіло поставляється в 20-мл флаконах одноразового використання, таких як ті, що поставляються компанією ImmunoGen, Inc. (Кембридж, Массачусетс). Кожен флакон містить білок в концентрації від 0,05 до приблизно 2,0 мг / мл в буферному розчині (pH 6,5±0,5), що складається в основному з одноосновного фосфату калію (0,57 мг / мл), моногідрату одноосновного фосфату натрію (0,20 мг / мл), двоосновного фосфату натрію (0,555 мг / мл) і хлориду натрію (8,16 мг / мл) в очищеній воді, згідно з Фармакопеею США. Лікарський засіб попередньо двічі фільтрується до вливання обсягу дози в інфузійний мішок методом пропускання його через 5-мк фільтр з низькою здатністю до зв'язування білка, після чого вводиться пацієнтам через внутрішній 0,22 мкм фільтр протягом 8 год. підготовки. Після інфузії внутрішньовенну лінію слід промити рідиною для забезпечення доставки повної дози препарату.

В цілому, при системному введенні антитіл бажано давати реципієнту дозу антитіл в діапазоні 1 нг / кг-100 нг / кг, 100 нг / кг-500 нг / кг, 500 нг / кг-1 мкг / кг, 1 мкг / кг-100 мкг / кг, 100 мкг / кг-500 мкг / кг, 500 мкг / кг-1 мг / кг, 1 мг / кг-50 мг / кг, 50 мг / кг-100 мг / кг, 100 мг / кг-500 мг / кг (ваги тіла реципієнта), хоча можливе застосування більш низьких або більш високих доз. Дозування, що становлять близько 1,0 мг / кг, вже можуть бути в деякій мірі ефективними. Переважним вважається дозування 5 мг / кг, хоча також переважними вважаються дози до 50 мг / кг, особливо при терапевтичному застосуванні. В інших випадках можливе введення зазначеної кількості антитіл незалежно від ваги тіла пацієнта, наприклад, в діапазоні 1 мкг-100 мкг, 1 мг-100 мг або 1 г-100 г. Наприклад, можливо спрямоване введення в ту чи іншу частину тіла або порожнину, такі як внутрішньосуглобове введення, всередину бронха, внутрішньочеревне, всередину капсули, хряща, порожнини, інтрацеліальне, всередину мозочка, шлуночка мозку, всередину товстої кишки, шийки, шлунка, печінки, міокарда, всередину кістки, таза, перикарда, порожнини живота, плеври, простати, легенів, усередину прямої кишки, всередину нирки, сітківки, хребта, суглобової сумки, грудної клітини, всередину матки, сечового

міхура, всередину пошкодженої тканини, вагінально, ректально, за щоку, під язик, інтраназально або трансдермально.

Лікувати пацієнта можна одноразовою дозою, або – що краще – за схемою з багаторазовим введенням препарату, при цьому первинний курс лікування може складатися з 1-10 доз, і далі, через певні проміжки часу, так, щоб імунна відповідь зберігалася або посилювалася (наприклад, через 1-4 місяці – друга серія доз і, при необхідності, ще через кілька місяців – наступна серія). Приклади відповідних схем лікування включають: (i) 0, 1 місяць і 6 місяців, (ii) 0, 7 днів і 1 місяць, (iii) 0 і 1 місяць, (iv) 0 і 6 місяців, або інші схеми, що дозволяють отримати бажану відповідь, при якій очікується послаблення симптомів захворювання або ступеня тяжкості захворювання.

6. Готові продукти, що включають CD27-нейтралізуючі антитіла

Винахід включає готовий продукт, що містить речовини, придатні для лікування розладів, описаних вище, містить CD27-нейтралізуючі антитіла, контейнер і етикетку або листок-вкладиш на контейнері або прикріплений до контейнера. Готовий виріб переважно містить щонайменше один флакон, що містить розчин щонайменше одного CD27-нейтралізуючого антитіла з запропонованими буферними розчинами і / або консервантами, можливо у водному розчиннику, де зазначений пакувальний матеріал містить етикетку, яка вказує, що такий розчин може зберігатися протягом певного періоду часу. Винахід може включати готовий виріб, включаючи пакувальний матеріал, перший флакон, що містить ліофілізоване CD27-нейтралізуюче антитіло і другий флакон, що містить водний розчинник встановленого буферного розчину або консерванту, який відрізняється тим, що пакувальний матеріал містить етикетку, яка надає інструкцію лікаря або пацієнту по відновленню CD27-нейтралізуючого антитіла у водному розчиннику для приготування розчину.

Контейнери, що підходять, включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци і т.д. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер може мати стерильний доступ через порт (наприклад, контейнером може бути пакет розчину для внутрішньовенного вливання або флакон з пробкою, додатково його можна проколоти голкою для підшкірних ін'єкцій).

Щонайменше одною з активних речовин в композиції є CD27-нейтралізуючі антитіла. На етикетці чи листку-вкладиші зазначено, що композиція використовується для лікування за призначенням, наприклад, СЧВ. Листок-вкладиш тут може вказувати, що антитіло або композиція використовується для лікування стану, який не дає відповіді або проявляє погану реакцію на лікування та використання стандартних методів надання медичної допомоги, як зазначено в цьому документі для конкретних захворювань і діагнозів. В інших варіантах здійснення даного винаходу листок-вкладиш може вказувати, що антитіло, антитіло-кон'югат або композицію можна також використовувати для лікування захворювання, що характеризується необхідністю модулювати імунну відповідь клітинних процесів із залученням CD27.

Ще одним аспектом цього винаходу є набір для виявлення CD27 в біологічному зразку. До складу набору входять упаковки з одним або більшою кількістю антитіл, що зв'язуються з епітопом CD27 та інструкції з використання антитіл для зв'язування з утворенням імунологічного CD27 комплексу, який потім можна виявити, при цьому наявність або відсутність імунологічного комплексу корелює з присутністю чи відсутністю у зразку CD27. Приклади упаковок: багатолункові планшети, які дозволяють виявляти CD27 одночасно в багатьох зразках.

Хоча винахід описано в загальному вигляді, здійснення винаходу будуть більш детально розглянуті в наведених далі прикладах.

ПРИКЛАД 1. CD27 РЕАГЕНТИ І МЕТОДИ

З метою отримання і тестування CD27-зв'язуючих моноклональних антитіл були отримані константи білків, які являють собою всю довжину людського CD70 і людського CD27, а також позаклітинного домену (ECD) людського CD27.

Людський CD27 (Пор. ід. №: 149) є трансмембранним білком 1-го типу, який складається з сигнального пептиду (залишки 1-20), позаклітинного (ECD, залишки 21-191), трансмембранного (ТМ, залишки 191-212) і внутрішньоклітинного (ICD, залишки 213-260) доменів. Людський CD70 (Пор. ід. №: 2) – трансмембранний поліпептид довжиною в 193 амінокислот, що складається з N-кінцевого фрагмента, внутрішньоклітинного домену (ICD, залишки 1-17), трансмембранного (ТМ, залишки 18-38) і позаклітинного домену (ECD, залишки 39-193). Вся послідовність, що кодує CD70, була клонально експресована на поверхні клітин НЕК 293.

Для проведення аналізу моноклональних антитіл методом ІФА і протеомного аналізу прямого зв'язування, амінокислоти 1-121 з ECD CD27 тимчасово експресували в клітинах НЕК293 з C-кінцевим His6-tag пептидом і очищали з використанням хроматографії іонів металів. Для аналізу фагів методами "пеннінг" та ІФА, амінокислоти 1-173 з ECD з c-кінцевим His6-tag

експресували з використанням НЕК і очищали з використанням хроматографії з іонами металів, а після цього – з використанням ексклюзійної хроматографії на колонці Superdex 75. Обидва цих білка CD27 були перевірені на біотинові мітки з використанням хімічного аналізу NHS-ефіру, спрямованого на амінові залишки на білку. Для кристалізації, амінокислоти 1-101 з С-кінцевим His6 – tag експресували в системі бакуловірусів і очищували з використанням хроматографії з іонами металів Proteose, Inc. Для імунізації мишей був придбаний білок CD27-Fc компанії R & D systems. Для деяких досліджень, всю послідовність, що кодує CD27, клонально експресували на поверхні клітин НЕК 293.

Людський CD27 і клони кДНК людського CD70 замовили в компанії Open Biosystems. Для створення експресуючих конструкцій використовували стандартні методи молекулярної біології. Скорочено, відкриті рамки читування генів CD27 і CD70 ампліфікували за допомогою ПЛР та клонували в експресуючі вектори ссавців методом перетравлення та лігування рестрикційної ендонуклеази або з використанням незалежного від лігування клонування (LIC). Повнорозмірні гени CD27 і CD70 клонували в експресуючі вектори і клонально експресували на поверхні клітин ссавців. Позаклітинний домен CD27 клонували в експресуючі вектори ссавців і тимчасово експресували в клітинах НЕК293 з гекса-his-кінцевим фрагментом.

Приклад 2. ОТРИМАННЯ CD27-НЕЙТРАЛІЗУЮЧИХ АНТИТІЛ

Мишачі анти-людські CD27 антитіла отримували методом гібридом за методом Kohler і Milstein (1975). Десять мишей C3H / HeJ у віці 12-14 тижнів придбали у компанії Charles River Laboratories. Мишей імунізували підшкірно (п / к) в основу хвоста (ОХ) з використанням 50 мкгм Hu CD27 Fc (R&D Systems) у поєднанні з $0,33 \times 10^5$ одиницями мишачого інтерферону-альфа і -бета (Biosource) в кінцевому обсязі 100 мкл в перший день. На 2-й і 3-й день мишам вводили інтерферони підшкірно в основу хвоста (із застосуванням тієї ж дози, що і в 1-й день). Мишам вводили бустер-ін'єкції з використанням 50 мкгм Hu CD27-Fc у поєднанні з 50 мкгм антимишачого агоністичного моноклонального антитіла CD40 (R&D Systems, MAB440) методом підшкірної ін'єкції в основу хвоста в ФСБ на 14-й день; за чотири дні до збору клітин селезінки для злиття.

Для аналізу титрів був виконаний фазовий ІФА з захопленням. Скорочено, планшети (Nunc-Maxisorp) покривали 0,1 мкгм козячого антимишачого Fc (Jackson Immunotech) і залишали на ніч у бікарбонатному буфері при температурі 4 °С. Після етапів блокування і промивки додавали розчини сироватки та планшети інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Після етапів промивки, планшети інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі з 0,25 мкгм / мл міченого біотином Hu CD27-ECD в блокуючому буфері і зондували з використанням HRP поміченого стрептавідину (Jackson Immunotech), розведеного в концентрації 1: 40,000 БСА / ФСБ протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети промивали, як описано вище; потім додавали розчин субстрату ОФД (Sigma fast tabs), інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, прояв кольору субстрату зупиняли додаванням 4N сірчаної кислоти 25 мкл / лунку і вимірювали поглинання при 490 нм.

Клітинний банк клітин несекретуючої мишачої мієломи для злиття був куплений в АТСС (# CRL-1646). Один заморожений флакон фолікулярних клітин відтавали і перерозчиняли в середовищі DMEM з (модифікованим) середовищем GlutaMax™ (Invitrogen) з додаванням 10 % (об / об) ФБС (Hyclone). У Charles River Laboratories клітини були вирощені, кріоконсервовані і були визнані стерильними і такими, що не містять мікоплазми. Клітинна лінія C1833A (Centocor) також застосовувалася при проведенні даного злиття. Ця клітинна лінія була отримана на місці методом приглушення експресії гена CHOP (БЯКХ) в фолікулярній клітинній лінії, тому вона потребує вирощування в умовах селекції з використанням генетіцину. Клітини обробляли так само, як описані вище фолікулярні, за винятком тих, які вирощували в середовищі DMEM з використанням середовища GlutaMax™ (модифікованого) з додаванням 10 % (об / об) ФБС (Hyclone) і 500 мкг / мл генетіцину. Обидві клітинні лінії, як фолікулярна, так і C1833A були піддані синхронізації клітин до злиття. Скорочено, $1,5-2 \times 10^8$ клітин висівали в 180 мл середовища DMEM з середовищем GlutaMax™ (модифікованим) з додаванням 0,25 % (обсяг / об'єм) ФБС (Hyclone) і інкубували при температурі 37 °С протягом 13 годин. Додатково 20 мл ФБС додавали до кінцевої концентрації ФБС 10 % і інкубували до використання протягом додаткових 13 годин при температурі 37 °С. C1833A клітини постійно перебували під впливом селекції генетіцину протягом процесу синхронізації клітин. клітини мієломи промивали в ФСБ, підраховували і визначали їх життєздатність за допомогою програмного забезпечення Guava Viacount до злиття.

У день злиття тварини були вбиті методом асфіксії CO₂. Селезінки видаляли асептично і занурювали в 10 мл холодного фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ), що містить антибіотики (PSA) (Sigma).

Суспензію окремих клітин спленоцитів виготовляли і піддавали РБК лізису з використанням РБК буфера для лізису (Sigma). Промиті клітини були помічені для магнітного сортування відповідно до вказівок виробника, з використанням анти-мишачих Thy1.2, анти-мишачих / людських CD11b і анти-мишачих IgM магнітних кульок (Miltenyi Biotec # 130-049-101, 130-149-601 і 130-047-301 відповідно), а потім сортували за допомогою інструменту AutoMacs Pro, запустивши програму Deplete. Як непомічені (блазмоби, збагачені В-клітинами), так і помічені фракції клітин збирали, потім підраховували за допомогою Guava PCA. Позитивно помічені клітини викидали. Непомічені клітини були розділені навпіл для злиття з обома партнерами злиття, FO і C1833A. Злиття проводили при співвідношенні 1:1 мишачих мієломних клітин з життєздатним клітином селезінки відповідно до методу De St. Groth (J Immunological Methods. 35:1-21. 1980). Скорочено, клітини селезінки і мієломні клітини змішували, осаджували та промивали один раз в 50 мл ФСБ. Осад ресуспендували в 1 мл розчину поліетиленгліколю (ПЕГ) (2 г ПЕГ з молекулярною масою 4000, 2 мл DMEM, і 0,4 мл DMSO) при температурі 37 °C протягом 30 секунд. Клітинну / зливу суміш потім занурювали у водяну баню при температурі 37 °C протягом приблизно 60 секунд і при повільному помішуванні. Реакція злиття була зупинена шляхом повільного додавання DMEM при температурі 37 °C протягом 1 хвилини. Злиті клітини залишали у спокої або на 5 хвилин при кімнатній температурі, а потім центрифугували при 150 мкг протягом 5 хвилин. Потім клітини перерозчиняли в середовищі HAT [DMEM з Glutamax™ (модифікованому), з додаванням 20 % ФСБ, 5 % Оріген, 25 мкг / мл гентаміцину (Sigma) і HAT (100 мкМ гіпоксантина, 0,4 мкМ аміноптерину, і 16 мкМ тимідину (Sigma) і висівали в 96-лункові плоскодонні планшети з полістиролу для вирощування тканинних культур (Corning # 3997) або метілцеллюлозне середовище (StemCell Technologies, MediumD cat # 03804), що містить ~ 2,25 мкг / мл AF488 людського CD27 (Janssen Research & Development, LLC). Планшети інкубували в зволоженому інкубаторі при температурі 37 °C з вмістом 7 % CO₂ протягом 7-10 днів. Поодинокі колонії були відібрані з метілцеллюлозних планшет для скринінгу з використанням ClonепіхFL або під мікроскопом при білому світлі.

ПРИКЛАД 3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ РЕКОМБІНАНТНИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ

Здатність зв'язуючих доменів з мишачих антитіл зв'язуватися з CD27 і блокувати певні біоактивності CD27 була проаналізована за допомогою різних аналізів in vitro, як описано нижче.

Твердофазний ІФА використовували для скринінгу гібридомних супернатантів на наявність антитіл, здатних зв'язуватися з людським CD27. Планшети (Nunc-Maxisorp # 446612) покривали і залишали на ніч 4 мкг / мл Fab козячого антитіла huFc (Jackson # 109-006-098) в бікарбонатному буфері О / N при температурі 4 °C. Або не промиваючи, лунки блокували з використанням 200 мкл 0,4 % (маса / об'єм) бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в ФСБ протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання з використанням 0,15 М сольового розчину, що містить 0,02 % (маса / об'єм) Tween 20, на планшетки додавали 50 мкл huCD27-Fc в 0,4 % БСА / ФСБ протягом 1 год. при кімнатній температурі. Знову після промивання, 50 мкл нерозбавлених супернатантів гібридами інкубували на покритих планшетах протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети промивали три рази, а потім інкубували з використанням 50 мкл козячого антимишачого антитіла Fc HRP (Jackson # 115-036-071), розведеного у співвідношенні 1:10000, протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети знову промивали і проявляли, як описано вище для оцінки титрів. Для оцінки відносної зв'язувальної здібності моноклональних антитіл гібридами, проводили аналогічний аналіз з використанням 384-лункових планшет MaxiSorp (NUNC 464718) з використанням серійно розведених супернатантів гібридами (нормалізованих до початкової концентрації 5 мкг / мл. Цей аналіз визначив 386 позитивних гібридом.

Всі 386 CD27-специфічних гібридом піддавали скринінгу на здатність пригнічувати зв'язування huCD27 з huCD70 з використанням біохімічних аналізів зв'язування з IM-9 клітинами, В-лімфобластоїдна клітинна лінія показала ендогенну експресію людського CD70. Планшети Maxisorp (VWR # 62409-314) покривали рекомбінантним людським CD27 / Fc (R&D Systems, Cat # 382-CD) при 250 нг (нг / мл) і інкубували протягом ночі при температурі 4 °C. На наступний день планшети блокували блокуючим буферним розчином (Pierce, Cat # 37543), а потім промивали промивальним буферним розчином I, який містить БСА без Ca++ і Mg++, 0,01 % Tween-20. Контрольні суміші (мишаче моноклональне антитіло до hCD27, R&D Systems, Cat # MAB382; ізотопічний контроль мишачого IgG1, R&D Systems, Cat # MAB002; ізотопічний контроль мишачого IgG2a, R&D Systems, Cat # MAB003) включали в кожний планшет. 50 мкл / лунку зразка гібридами або контрольних речовин змішували з 50 мкл / лунку зібраних IM-9 клітин, людської В-лімфобластоїдний клітинної лінії (ATCC, CCL-159) і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі без струшування. Наприкінці інкубації планшети промивали промивальним буферним розчином II, щоб видалити всі незв'язані осередки, а потім лізували з

використанням 50 мкл / лунку реагенту Cell Titer Glo (Promega, Cat # G7571). Через 10 хвилин інкубації при струшуванні, планшети зчитували на системі Envisionn (PerkinElmer, 2102 Multilabel reader). Отриманий люмінесцентний сигнал пропорційний кількості присутнього ATP і безпосередньо корелює з кількістю живих клітин, присутніх у захопленій лунці при зв'язуванні з CD27. На основі результатів біохімічного аналізу зв'язування, близько 50 % CD27-специфічних клонів були нейтралізуючими.

Для усунення надлишку нейтралізуючих клонів проводили конкурентний аналіз зв'язування для розподілу антитіл за конкурентними групами. При проведенні даного аналізу, супернатанти гібридами оцінювали окремо, як реагенти захоплення і виявлення для кожної з позитивних гібридом в панелі. Антитіла, що утворюють ефективні реагенти захоплення / виявлення один з одним, швидше за все, ідентифікують просторово розділені епітопи на білку CD27, таким чином, дозволяючи обом антитілам в один і той же час зв'язуватися з білком-мішенню. Групи клонів, що володіють аналогічними моделями активності по всій панелі, ймовірно, зв'язуються з аналогічними епітопами. Вибір клонів з різних груп, отже, пропонує антитіла, що ідентифікують різні епітопи. Скорочено, 384-лункові планшети Nunc Maxisorp (464718) покривали козиними антимишачими антитілами Fc (JIR115-005-071) в покриваючому буфері протягом ночі при 4 °C. Потім планшети блокували з використанням 0,4 % БСА у ФСБ протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. на цьому етапі і на всіх наступних етапах планшети промивали з використанням ФСБ, 0,02 % Tween-20. Кожна лунка ряду (один ряд на супернатант) отримала 20 мкл супернатанту (чистий супернатант використовували для початкового скринінгу, а для повторного скринінгу підклони нормалізувати до 2 мкг / мл мат) разом з контрольними речовинами (мишачий анти-huCD27, R&D Systems, Cat # MAB382; мишачий ізотопний контроль Cat # 555439, Becton-Dickenson), потім інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Після промивання, 25 мкл немічених Hu CD27-ECD-His-tag приготували в ФСБ плюс 10 % мишачої сироватки (мишача сироватка Bioreclamation CD-1 партія №MSEBREC.18565) при 0,3 (або 0,8 для нормалізованої концентрації) мкг / мл було додано в усі лунки, потім їх 30 хвилин інкубували при кімнатній температурі, потім промивали. Кожен супернатант додавали вниз по колонці і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі з використанням 25 мкл суміші, приготованої таким чином: (-попередньо інкубовані супернатанти з козячим антимишачим антитілом Fc HRP (Jackson 115-036-008), суміш 150 мкл козячого антимишачого антитіла Fc HRP в співвідношенні 1:1000 з кожними 1000 мкл супернатанту (для первинного скринінгу) або 90 мкл у співвідношенні 1:2000 на 600 мкл супернатанту з доведенням до 2 мкг / мл: (для підклонів повторного скринінгу). Через 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі додали 200 мкл 100 % нормальної мишачої сироватки на мл і інкубували ще 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети промивали, потім інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі з використанням 100 мкл / лунку цитрат-фосфатного розчину субстрату (0,1 М лимонної кислоти і 0,2 М фосфату натрію, 0,01 % H₂O₂ і 1 мг / мл ОФД). Прояв субстрату зупиняли додаванням 25 мкл 4N сірчаної кислоти і вимірювали поглинання при 490 нм з використанням автоматичного спектрофотометра для прочитання планшет. Цей аналіз зв'язування визначив три групи, які ідентифікують позиції зв'язування на антигені huCD27, що не перекриваються. Відібрані антитіла з усіх трьох груп були розширені для виробництва антитіл, очищення та подальшого тестування в функціональних аналізах.

Інгібування клітинної сигналізації

Зв'язування CD70 з CD27 викликає сигналізацію, що призводить до низхідної активації фактора транскрипції, NF – κ B. Був створений аналіз репортера NF- κ B для подальшої характеристики антитіл. Аналіз проводили у двох режимах: (1) для оцінки антагонізму антитіл методом нейтралізації CD70, індукованої активації CD27 і (2) для оцінки агонізму антитіл методом активації сигналізації CD27 без лігування CD70. HEK-293F клітини трансфікували із загальною кількістю ДНК 36 нг, що містила як людський CD27, так і конструкти люціфери, під контролем промотора NF- κ B. Трансфектанти HEK-293F наносили на планшети 5 × 10⁴ клітин на лунку в 40 мкл середовища Freestyle (Gibco) на 96-лункові планшети. Розчини CD27-нейтралізуючих гібридомних моноклональних антитіл були додані на аналітичний планшет в середовищах Freestyle (Gibco) для кінцевої концентрації 50 мкг / мл з розведенням в співвідношенні 1:3 і планшети інкубували при температурі 37 °C (95 % O₂ / 5 % CO₂) протягом 1 години. Для аналізу здатності моноклональних антитіл гібридами нейтралізувати сигналізацію CD70:CD27, остаточно опромінені (4000 рад) епісомні клітини HEK – 293E CD70 додавали в концентрації 20 % від числа трансфектантних клітин CD27 на аналітичний планшет. Для тестування активності агоніста гібридомних моноклональних антитіл, додавання епісомальної клітин CD70 не проводилося. Аналітичні планшети інкубували протягом ночі при температурі 37 °C (95 % O₂ / 5 % CO₂) і проявляли з використанням системи для аналізу люціфери Steady-

Glo® Luciferase Assay System (Promega) відповідно до інструкцій виробника. Чотири CD27-нейтралізуючі моноклональних антитіла гібридами, C2177, C2186, C2191 і C2192, які залежно від дози блокували CD70-опосередковану сигналізацію CD27, не викликаючи значну дозозалежну агоністичного активацію рецептора CD27 при відсутності стимулятора CD70, були обрані для проведення подальшої характеристики. IC₅₀ s для блокування зв'язування IM-9 клітин з опосередкованою сигналізацією CD27 і CD70 в аналізі гена-репортера NF-κβ для цих чотирьох антитіл наведені в таблиці 1. Агоністична активність в аналізі гена-репортера NF-κβ показана як кратне збільшення сигналізації CD27 щодо стороннього контрольного ізотипа антитіла (мишачий IgG1 до щурячого білку EMP) при відсутності стимулятора CD70 при

Афінність для CD27

Антитіла K_D C2177, C2186, C2191 і C2192 для мономірного розчинного CD27 при температурі 25 °C були виміряні за допомогою Biacore і наведені в таблиці 1. Аналізи проводилися на системі BIACORE 3000 (BIAcore, Inc.), інструменті поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Зразки готували у фосфатно-сольовому буферному розчині Дульбекко з pH 7,4, що містить 0,005 % поверхнево-активної речовини (полісорбат 20). Козяче анти-мишаче Fc-специфічне антитіло (Jackson Immunoresearch laboratories Prod # 115-005-071) було ковалентно приєднане на золоті поверхні, покриті карбоксиметил декстраном (CM-5 Chip, Biacore). Сенсор перед іммобілізацією попередньо обробляли розчинами 50 mM NaOH, 100 mM HCl і 0,1 % додецилсульфату натрію з ін'єкцією деіонізованої води між етапами попередньої обробки. Антитіла розбавили в 10 mM буферного розчину ацетату натрію pH 4,5 і пов'язали з карбоксиметильованою поверхнею декстрану сенсора згідно з інструкцією виробника щодо хімічних процесів сполучення амінів. Решту реакційноздатних груп на поверхні дезактивували за допомогою етаноламіну-HCl. Моноклональні антитіла були захоплені на поверхні датчика через домен Fc. Асоціації ECD людського CD27, що вводяться в зростаючих концентраціях (0,6-150 нм, 4-кратні серійні розведення) спостерігали протягом трьох хвилин, а дисоціації – протягом десяти хвилин. Регенерація захоплення поверхонь до вихідної була оптимізована за допомогою двох трисекундних впливів 100 mM фосфорної кислоти. Дані обробляли за допомогою програмного забезпечення Scrubber, версія 1.1 г (BioLogic Software). Подвійну субстракцію даних проводили для корекції впливу буфера на шум від сигналу та інструменту. Кінетичний аналіз опрацьованих даних проводили з використанням програмного забезпечення Biaevaluation 4.0.1 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). Профілі зв'язування описували за допомогою моделі зв'язування 1:1 із зазначенням моновалентного зв'язування CD27.

Таблиця 1

		Biacore	IM-9 зв'язування ¹	репортерний ген NF-κβ	
		K _D	IC ₅₀	IC ₅₀ ²	Агонізм ³
МКАТ	ізотипів	нМ	мкг / мл	мкг / мл	при 50 мкг / мл
C2177	mlgG1	307	0,063	0,040	1,850
C2186	mlgG1	2,55	0,059	0,105	2,547
C2191	mlgG1	2,62	0,059	0,080	3,053
C2192	mlgG2a	0,21	0,054	0,232	5,394

¹ IC 50 для інгібування моноклональними антитілами зв'язування IM-9 клітин з іммобілізованим CD27

² IC 50 для інгібування моноклональними антитілами в аналізі гена-репортера

³ Агоністична активність моноклональних антитіл при 50 мкг / мл у відсутності CD70, виміряна як кратне збільшення в сигналі гена-репортера по відношенню до антитіл ізотопічного контролю.

Інгібування клітинної проліферації

Проліферація Т-клітин, субоптимально активована в культурі з антитілами анти-CD3 плюс анти-CD28, посилюється CD70-лігуванням CD27, що експресується на Т-клітинах. Чотири мишачі нейтралізуючі антитіла оцінювали за їх здатністю пригнічувати проліферацію Т-клітин у присутності CD70 і індукувати проліферацію при відсутності CD70. Заморожені CD4 + Т-клітини були придбані у AllCells, LLC. Клітини відтавали і поміщали в IMDM середовище, що містить 10 % ФБС, 1 % І-глутаміну і 1 % пеніциліну з стрептоміцином. Перед посівом клітин, антитіло анти-CD3 (ОКТ3) наносили на U-подібне дно планшету в концентрації 1 мкг / мл в ФБС

протягом ночі при температурі 4 °С. Клітини підраховували, доводили до концентрації 1×10^6 клітин / мл і висівали при концентрації 1×10^5 клітин / лунку. Розчинну анти-CD28 додавали в якості вторинного сигналу активації при концентрації 1 мкг / мл на лунку. Опромінені (6000 рад) НЕК-клітини, трансфіковані людським CD70 або тільки вектором (макетом), додавали у відповідні лунки по 2×10^4 клітини / лунку (20 %). Клітини стимулювали протягом 3 днів, 0,9 мкКі тимидина [метил-3H] додавали в лунки всіх зразків і клітини інкубували протягом 18-24 годин. На четвертий день стимуляції клітини збирали на фільтрувальний планшет за допомогою збирача клітин PE Filtermate Harvester. Планшет висушували і додавали 30 мкл MicroScintTM-20 у всі лунки зразків. Дані зчитували з планшета за допомогою PE TopCount NXT і зібрані дані були наведені у вигляді CPM. Антитіло C2177 показує дозозалежне інгібування CD70-опосередкованої проліферації Т-клітин і дуже слабку внутрішню агоністичну активність у відсутності CD70 (Фіг. 1). Аналогічні результати були отримані для антитіл C2186, C2191 і C2192. IC₅₀ та максимальний % інгібування цих антитіл наведені в таблиці 2. Жодне з антитіл не показало послідовної стимуляції проліферації при відсутності лігування CD70, що вказує на відсутність внутрішньої агоністичної активності.

Крім того, антитіла C2177, C2186, C2191 і C2192 показали дозозалежне інгібування CD70-опосередкованої проліферації Т-клітин згідно з результатами вимірювань при проведенні аналізу з використанням CFSE (сукцінімідільного ефіру карбоксифлуоресцеїна) при відсутності ефекту на проліферацію при відсутності стимулятора CD70. Заморожені CD3 + Т-клітини були придбані у AllCells, LLC. Клітини відтанули і помістили в IMDM середу, що містить 10 % ФБС, 1 % L – глутаміну і 1 % пеніциліну з стрептоміцином. Клітини попередньо позначили 2,5 мМ CFSE (Invitrogen), погасили додаванням ФБС і промили Т-клітинним середовищем. CFSE є барвником, що пасивно дифундує в клітини і стає високофлуоресцентним при зв'язуванні з внутрішньоклітинними амінами. При поділі клітин, кожна дочірня клітина буде містити половину CFSE-мітки материнської клітини, таким чином, проліферацію клітин можна контролювати, відстежуючи кількість клітин з різною інтенсивністю CFSE. Клітини доводили до концентрації 1×10^6 клітин / мл і висівали 1×10^5 клітин / лунку. Перед висівом клітин, антитіло анти-CD3 (ОКТ3) наносили на U-подібне дно планшета при концентрації 0,5 мкг / мл в ФБС протягом ночі при 4 °С. Розчинне анти-CD28 додавали як вторинний сигнал активації при концентрації 1 мкг / мл на лунку Опромінені (6000 рад) НЕК-клітини, трансфіковані людським CD70 або тільки вектором (макетом), додавали у відповідні лунки по 2×10^4 клітини / лунку (20 %). Клітини стимулювали протягом 4 днів і аналізували за допомогою аналізу FACS для розрахунків розділених клітин, що містять різні рівні інтенсивностей CFSE-мітки.

Інгібування диференціації бластних клітин плазми

CD27-нейтралізуючі моноклональні антитіла гібридами були також протестовані методом аналізу диференціації бластних клітин плазми з використанням первинних В-клітин людини. CD19 + В-лімфоцити людини, які були негативно відібрані з периферичної крові здорових донорів (придбані у AllCells), культивували протягом 6 днів при наявності або 1 мкг / мл антитіла анти-CD40 (клон MAB89, Abcam) і 100 нг / мл інтерлейкіну 21 (Invitrogen), або 1 мкг / мл розчинного людського рекомбінантного CD40-ліганду, 2 мкг / мл "підсилювача для ліганду" (обидва Alexis Biochemicals) і 100 нг / мл інтерлейкіну 21 у 96-лункових планшетах при концентрації 10^5 В-клітин на лунку. CD27-нейтралізуючі антитіла гібридами або антитіла для ізотопічного контролю додавали при наявності або відсутності 2×10^4 опромінених (6000 рад) CD70-експресуючих клітин НЕК 293 або МОСК-трансформованих клітин НЕК 293. CD27-нейтралізуючі моноклональні антитіла гібридами і відповідні ізотопічні контролю використовували у концентрації 25, 2,5 і 0,25 мкг / мл. На 6-й день зразки клітин аналізували методом потокової цитометрії та ідентифікували фракції бластних клітин плазми як пряме світорозсіання / високе, IgDмінус, CD38яскраве, CD20низьке. Ефект CD27-нейтралізуючих моноклональних антитіл розраховували як частоту прояви бластних клітин плазми в В-клітинних культурах, що містять CD70-експресуючі клітини і моноклональні антитіла гібридами, нормовані до частоти бластних клітин плазми у відповідних В-клітинних культурах, що містять ложнотрансфіковані клітини. Відсоток інгібування моноклональними антитілами C2177, C2186, C2191 або C2192 при концентрації 2,5 мкг / мл показано у таблиці 2. Агоністична активність при відсутності стимулятора CD70 не спостерігалася для жодного з цих моноклональних антитіл.

Таблиця 2

	Проліферація Т-клітин – CD4 + клітин		Диференція бластних клітин плазми
MAb	IC ₅₀ мкг / мл	Відсоток інгібування при найвищій концентрації (30 мкг / мл) (Середнє ± стандартна помилка середнього)	Процент інгібування при концентрації 2,5 мкг / мл (Середнє ± стандартна помилка середнього)
C2177	0,245	75,4±4,1 (n=6, 2 донора)	78±20 (n=4)
C2186	0,775	65,3±4,4 (n=6, 2 донора)	93±27 (n=4)
C2191	0,3	58,3±6,0 (n=6, 2 донора)	105±9 (n=4)
C2192	0,445	75,7±5,7 (n=6, 2 донора)	74±0 (n=2)

ПРИКЛАД 4. КАРТУВАННЯ ЕПІТОПІВ І УГРУПУВАННЯ

Для більш ретельної оцінки початкового зв'язування були проведені аналізи конкуренції з використанням деяких очищених нейтралізуючих моноклональних антитіл і з використанням CD27-нейтралізуючого антитіла, MAB 382 (R&D Systems). Скорочено, 5 мкл (10 мкг / мл) химерного білка CD27-Fc (R&D Systems, Cat # 382-CD) наносили на планшет MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) протягом 2 годин при кімнатній температурі. У кожному лунку додавали 5 % блокуючого буфера A MSD (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) і інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі. Планшети промивали три рази з використанням 0,1 М буферного розчину HEPES, pH 7,4, з подальшим додаванням суміші 10 нМ поміченого антитіла CD27 з різними концентраціями конкуруючого антитіла (1 нМ – 2 мкМ). Антитіла були помічені з використанням NHS-ефіру MSD Sulfo-TagTM, аміно-реактивного N-гідроксисукцинімідного ефіру, який з'єднується з первинними аміногрупами білків для утворення стабільного амідного зв'язку. Після 2-годинної інкубації при обережному струшуванні при кімнатній температурі, планшети промивали 3 рази з використанням 0,1 М буферного розчину HEPES (pH 7,4). Буферний розчин MSD Read Buffer T чотирикратно розводили дистильованою водою і вносили в лунки в обсязі 150 мкл / лунку. Планшети аналізували з використанням аналізатора SECTOR Imager 6000, який визначає електрохемілюмінесценцію за допомогою міток Sulfo-Tag, які випромінюють світло при електрохімічній стимуляції, ініційованої на електродних поверхнях мікропланшеток MSD.

Дослідження конкуренції визначили три конкуруючі групи для антитіл, наведені в таблиці 3, підтверджуючи результати початкових аналізів зв'язування. C2179, C2192 і MAB382 складають першу групу; C2177, C2182, C2186 і C2193 – друга група; та C2191 становить окрему групу

Таблиця 3

Помічене	антитіло, що конкурує				
	C2179	C2177	C2182	C2186	C2191
C2177	-	+	+	+	-
C2179	+	-	-	-	-
C2182	-	+/-	+	+	-
C2186	-	+	+	+	-
C2191	-	-	-	-	+
C2192	+	-	+	+	-
C2193	-	+/-	+	+	-
MAB382	+	-	-	-	-

ПРИКЛАД 5. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕПІТОПІВ ТА ПАРАТОПІВ МЕТОДОМ РЕНТГЕНІВСЬКОЇ КРИСТАЛОГРАФІЇ

Докладні епітопи і паратопи антитіл C2177 і C2191 були визначені шляхом спільної кристалізації їх відповідних Fabs з ECD фрагментом CD27 (залишки 1-101) як визначення тримерного комплексу та структури методом рентгенівської кристалізації. His-мічені химерні варіанти (мишачий варіабельний домен, людський константний домен) C2177 Fab і C2191 Fab експресували в клітинах HEK293 і очищали з використанням афінної і ексклюзійної хроматографії. His-мічений фрагмент ECD (залишки 1-101) людського CD27 потім очищали з використанням аніонообмінної хроматографії. Потрійний комплекс CD27:C2177 Fab:C2191 Fab отримували шляхом змішування CD27 з надлишком Fab в молярному співвідношенні

1:1,25:1,25. Комплекс інкубували протягом 2 год. при температурі 4 °C, відокремлювали від незакомплексованих видів з використанням ексклюзійної хроматографії і доводили до концентрації до 12 мг / мл в 20 мМ Тріс рН 8,5, 250 мМ NaCl. Кристалізацію комплексу проводили за допомогою методу дифузії пари в положенні сидячих крапель при температурі 20 °C. Кристали комплексу були отримані з 24 % ПЕГ 3350, 0,2 М розчину хлориду амонію, 0,1 М Тріс-буфера, рН 8,5. Для рентгенівського збору даних, один кристал змочували протягом декількох секунд в кріозахисному розчині, що містить розчин для кристалізації з додаванням 20 % гліцерину і миттєво заморожували в потоці азоту при 100 К. Дифракційні дані збирали з використанням рентгенівського генератора Rigaku MicroMaxTM-007HF, оснащеного детектором Saturn 944 CCD та кріоохолоджуючою системою X-Stream 2000 (Rigaku) з обертанням кристала більше 240° з експозиціями протягом 2 хвилин на 0,25°-зображення і обробляли за допомогою програми XDS (Kabsch W. 2010. Acta Crystallogr. D66:125-132). Кристали належать до моноклінної просторової групи P21 з наступними параметрами елементарної комірки: a=141,1 Å, b=53,0 Å, c=143,4 Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 112,2^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

Кристалічна структура потрійного комплексу була визначена з роздільною здатністю 3,5 Å і очищена до кристаліграфічного R-фактора 26 %. Fabs C2177 і C2191 зв'язуються з CD27 на епітопах, що не перекриваються та просторово розрізняються (Фіг. 2). Fab C2177 зв'язується з N-кінцевою ділянкою (розташованою дистально від поверхні клітини) CD27. Епітоп покриває 700 Å² і включає 9 залишків: K5, S6, P8, H11, W13, G16, K17, H36, R37 (Фіг. 3). Паратоп визначається як залишки антитіл, що контактують (в межах 4 Å) з антигеном. Паратоп C2177 включає 5 залишків з VL (Y31, Y36, Y53, N57, N96) та 9 залишків з VH (S31, W33, Y52, D55, D57, Y101, Y102, D104, Y105) (Фіг. 3). Всі 6 CDR залучені в процес розпізнавання антигену. H36 і R37 є центральними залишками епітопу. Вони накладаються на Y31 з VL і Y102 з VH; H36 також утворює сольовий місток до D104 з VH.

C2191 Fab зв'язується з CD27 на "бічний" поверхні (Фіг. 2) і покриває 800 Å² поверхні. Епітоп включає в себе 10 залишків: F28, D43, P44, I46, P47, G48, V49, H60, S63, H66. Паратоп C2191 включає 7 залишків з VL (Y34, F36, Y53, L54, R96, L98, W100) і 8 залишків з VH (S31, Y32, Y50, N57, Y59, R100, G101, N102) (Фіг. 4). Взаємодії антиген-антитіло домінують при гідрофобних взаємодіях між залишками 44-49 CD27 і гідрофобним "петчем" CDR з VL.

Різне розташування епітопів C2177 і C2191 передбачає різний механізм дії даних антитіл. C2191, ймовірно, безпосередньо конкурує з ECD CD70 за перекривання епітопів на "бічний" поверхні CD27. Антитіло C2177, навпаки, не вступає в боротьбу за той же епітоп, а запобігає підходу клітин, які несуть CD27 і CD70. Це спостереження підтверджується тим фактом, що C2191 запобігає зв'язуванню розчинного ECD CD70 з CD27, тоді як C2177 не запобігає йому.

ПРИКЛАД 6. МОДУЛЮВАННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ВІД ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ АНТИТІЛА

Імунодефіцитна мишача модель миші NOD / SCID-IL2Ry^{null} (NSG) була розроблена з метою вивчення аспектів контролю людської імунної системи відповідями Т-клітин (Markus G Manz & James P Di Santo Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology Nature Immunology 10, 1039 – 1042 (2009)). Адоптивне перенесення людського МНПК мишам з ослабленим імунітетом (NSG) використовували для оцінки впливу анти-CD27-антитіла на приживлення і / або проліферацію клітин людини. Модель дозволяє оцінити ефект від націлювання людського CD27 на вироблення антитіл і опосередковані Т-клітинами відповіді.

Антитіла C2177 і C2191 вводили в момент перенесення клітин, а потім двічі на тиждень протягом 3 тижнів. На 21-й день мишей умертвляли, клітини крові і селезінки очищали і згодом характеризували за допомогою проточної цитометрії. CTLA4-Ig (Orencia, BMS) був включений у вигляді позитивного контролю імуносупресії. Приживлення / розподіл людських клітин вимірювали методом оцінки наявності CD45⁺ клітин у зразках крові та селезінки.

Проводили ретельний моніторинг мишей, а час умертвіння визначали на підставі симптомів ХГВН у відповідності з керівними принципами благополуччя тварин. Експериментальні показники використовували для оцінки ефектів лікування із застосуванням анти-CD27, які включали: масу тіла (щотижня двічі), ознаки, що спостерігаються за системою ХГВН (щотижня двічі), такі як положення тіла, рівень активності, догляд за поверхнею тіла, шкірні ураження (зокрема, навколо очей і вух) з використанням 1-5 бальної системи, абсолютна кількість підмножин людських клітин і статус активації за допомогою аналізу методом проточної цитометрії (1) введених людських МКПК, (2) мишачої ПК (один раз на тиждень) і (3) селезінки, а також кісткового мозку; визначення загального людського Ig, IgM і IgG в сироватці, селезінці і КМ за допомогою аналізу ІФА, а після умертвіння – проведення гістологічного і імуногістохімічного аналізу для визначення рівня інфільтрації людських клітин в органах-мішенях, таких як печінка, нирки, легені та селезінка.

Групи лікування були наступними:

1. МКПК (20-40 мільйонів клітин на мишу, і / п.)
2. МКПК + CTLA4-Ig (10 мг / кг)
3. МКПК + антитіло для ізотопічного контролю, двічі на тиждень протягом 3 тижнів
4. МКПК + анти-CD27 антитіло, двічі на тиждень протягом 3 тижнів

Миші, яким вводили моноклональні антитіла анти-CD27 дозою 10 мг / кг, C2177 і C2191 (антитіла гібридами, хімеризовані на людському IgG₄ (ala / ala, ser- & gt; pro) клітинному каркасі) мали меншу статистично значущу кількість людських CD45⁺ клітин в порівнянні окремо з МКПК або ізотопічним контролем в МКПК, ізольованого із зразків крові або селезінки.

ПРИКЛАД 7. АДАПТАЦІЯ ЛЮДСЬКОЇ КАРКАСНОЇ ДІЛЯНКИ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ C2177 І C2191

Антиген-зв'язуюча ділянку, а також ділянки, які використовуються для передачі антигенної специфічності від антитіл C2177 і C2191 людським каркасним ділянкам, були повторно класифіковані, як зазначено в патенті, опублікованому Raghunathan G. US20090118127 A1, 2009. Скорочено, антиген-зв'язуючі ділянки визначали з використанням різних термінів (огляд в Almagro and Fransson, Front Biosci 13: 1619-1633, 2008). Термін "Ділянки, що визначають компліментарність (CDRs)" ґрунтується на варіабельності послідовності (Wu and Kabat, J. Exp. Med. 132:211-250, 1970). Існує 6 CDR; три для V_H (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3) і 3 для V_L (L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). Термін "гіперваріабельні ділянки", "HVR's", або "HVL's" відноситься до ділянок варіабельної домени антитіла, що є варіабельними у своїй структурі, як визначено в публікації Chothia і Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Існує шість HVR, три для V_H (H1, H2 і H3) і три для V_L (L1, L2 і L3).

У методі адаптації людської каркасної ділянки, ділянки, націлені на перенесення специфічності нелюдських антитіл на людські каркасні ділянки (HFR) – це CDR, як визначено в публікації Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), за винятком ділянки, відповідної CDR-1 з V_H. Для цієї ділянки переносять комбінацію CDR і HVL (розширену CDR-1 з V_H) з нелюдського антитіла на людську каркасну ділянку (як зазначено в таблицях 30, 31, 34, 35). Крім того, були отримані і протестовані варіанти з більш короткими перенесеними CDR-H2 (іменовані Kabat-7 [Raghunathan G. US20090118127 A1, 2009]).

Вибір людської FR.

Людські FR, що визначаються як ділянки в варіабельних ділянках, що не містяться в антигензв'язуючому сайті, вибирали з репертуару функціональних людських генів зародкової лінії IGHV, IGKV, IGKJ і IGHJ. Репертуар послідовностей генів людської зародкової лінії був отриманий за допомогою пошуку в базі даних IMGT (Kaas, et al., Nucl. Acids. Ост. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P et al., Nucl. Acids Res., 33, D593-D597, 2005) та складання всіх алелей "01" станом на 01 жовтня 2007 року. З цієї компіляції видалили надлишкові гени (на 100 % ідентичні на амінокислотному рівні), а також гени з непарними цистеїновими залишками.

Первинний вибір людських послідовностей для HFR ділянки був заснований на схожості послідовності людських генів зародкової IGHV лінії з повнорозмірною мишачою ділянкою V_H, що включає FR з 1 по 3, а також H-CDR-1 і H-CDR-2. На наступному етапі вибрані людські послідовності були впорядковані по рангах з використанням оціночної шкали, яка враховує як довжину CDR, так і подібності CDR мишачих і людських послідовностей. Стандартну матрицю мутації, наприклад, матрицю заміщення BLOSUM 62 (Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci US A. 89, 10915-9, 1992) використовували для вирівнювання за бальною шкалою CDR мишачих і людських послідовностей, а також застосовували великі штрафи при виявленні вставки та / або делеції в петлях CDR. FR-4 був обраний на підставі подібності послідовностей генної зародкової лінії IGHJ (Kaas, et al., Nucl. Acids. Ост. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P et al., Nucl. Acids Res., 33, D593-D597, 2005) з послідовностями мишачих антитіл C2177 і C2191. Аналогічну процедуру використовували для вибору людських FR для V_L. Гени зародкової лінії IGKV використовували для вибору FR 1-3 і L-CDR 1-3. Гени зародкової лінії IGKJ використовували для вибору FR-4.

На додаток до критеріїв послідовностей, для фрагментів Fv була створена гомологічна 3D-модель з використанням програми моделювання (Sali and Blundell. J. Mol. Biol. 234: 779, 1993) з програмного пакета компанії Accelrys, Inc. Моделі використовували для аналізу варіантів HFR, включаючи характеристики CDR і оцінку здібностей, що вони проявляли. Додаткові аспекти вибору варіантів HFR полягали у зведенні до мінімуму кількості залишків метіоніну і триптофану, усуненні потенційних сайтів N-глікозилювання і підтримці людської зародкової лінії з найвищим профілем експресії in silico (de Wildt, J. Mol. Biol. 185: 895, 1999).

Для першого шляху адаптації каркасної ділянки та оптимізації C2177 в бібліотеку були включені шість V_H і чотири V_L варіантів HFR. V_H і V_L варіанти HFR були об'єднані по парам комбінаторним способом для отримання 24 варіантів HFR плюс 10 контрольних пар всіх варіантів HFR з прототипом V ділянки C2177 плюс материнської C2177 для отримання в цілому 35 комбінацій. Аналогічно для C2191 п'ять V_H і чотири V_L варіантів HFR були об'єднані по парам комбінаторним способом для отримання 20 варіантів HFR плюс 9 контрольних пар всіх варіантів HFR з прототипом V ділянки C2191 плюс материнської C2191 для отримання в цілому 30 комбінацій. ДНК, що кодує вибрані варіабельні домени, була перекомпонована з використанням стандартних методів для складання всіх моноклональних антитіл з людським IgG1 і константною ділянкою карпа. Отримане контрольне химерне антитіло C2177, позначене як M40, складається з варіабельних ділянок H7 і L18. Отримане контрольне химерне антитіло C2191, позначене як M41, складається з варіабельних ділянок H10 і L20. Моноклональні антитіла тимчасово експресували в 48-лункових планшетах в клітинах HEK 293E. Надосадову рідину з культур протестували на експресію і активність зв'язування через 96 годин після трансфекції. Рівень експресії оцінювали з використанням технології Octet для вимірювання швидкості зв'язування антитіл з біосенсорами білка A. Рівень експресії вимірювали шляхом порівняння з еталонними зразками з відомою концентрацією антитіл. Була зібрана стандартна крива з 8 точок, що складається з серійного розведення антитіла ідентичного ізотипа в співвідношенні 1:2, починаючи з 100 мкг / мл. Біосенсиори гідратували протягом 10 хвилин в витраченому середовищі, а швидкість зв'язування стандартів і невідомих зразків вимірювали протягом 2 хвилин. Дані були проаналізовані з використанням рівняння з 5 параметрів зваженого дозозалежного ефекту і алгоритму швидкості зв'язування початкового нахилу. Зразки з експресією 1 мкг / мл були розбавлені до 1 мкг / мл з використанням витраченого середовища, а також був проведений скринінг з використанням однієї точки ІФА. Для даного аналізу ІФА на 96-лункові чорні планшети maxisorp наносили 100 мкл козячих антитіл до людського IgG FC з концентрацією 4 мкг / мл, розведених у карбонатно-бікарбонатному буфері, pH 9,4, при температурі 4°C протягом ночі, потім промивали тричі промивним буферним розчином (0,05 % розчин Tween-20 в ФСБ) і блокували 300 мкл розчину StartingBlock (Thermo Scientific) протягом 1 години з наступним промиванням, як описано вище. Зразки або стандарти розводили до концентрації 100 нг / мл у відпрацьованому середовищі і 100 мкл додавали на планшет для аналізу при кімнатній температурі протягом 1 години зі струшуванням. Планшети промивали тричі і додавали 50 мкл на лунку людського ECD CD27 з His-міткою при розведенні 60 нг / мл в аналізований буферний розчин (ФСБ з 1 % і 0,05 % Tween-20) і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання додавали по 50 мкл в лунку кон'югованого з пероксидазою пентагістидіна Qiagen з розведенням 1:2000 в буферному розчині для аналізу та інкубували 1 годину при кімнатній температурі зі струшуванням. Субстрат BM ChemiLum (BM Chemilum, POD, Roche) змішували відповідно до інструкцій виробника і після остаточної промивки на планшети додавали 50 мкл. Через 10 хвилин планшети зчитували на пристрої для прочитання планшетів Perkin Elmer Envision Reader.

Результати скринінгу комбінаторної бібліотеки C2177 показали, що всі V-ділянки зв'язуються з CD27 з різною силою. Кілька варіантів HFR показали більш високий сигнал зв'язування, ніж материнська C2177, в той час як інші показали зв'язування, яке було порівняне або нижче за материнське. Всі V_L зв'язувалися з антигеном на всіх виявлених рівнях і не впливали на зв'язування варіантів HFR, що було виражене на виявлених рівнях, але нижче за материнське. Двадцять чотири антитіла C2177 HFR (комбінації V_H , V_L) показали зв'язування з CD27 і експресію на рівні 1 мкг / мл.

Результати скринінгу комбінаторної бібліотеки C2191 показали, що всі крім одного V_H зв'язувалися з CD27 з різними сигналами. Всі V_L показали зв'язування з CD27 за винятком об'єднаних в пари с V_H . Кілька варіантів HFR показали більш високий сигнал зв'язування, ніж материнська C2177, в той час як інші показали зв'язування, яке було порівняне або нижче за материнське. Сімнадцять антитіл C2191 HFR (комбінації V_H , V_L) продемонстрували зв'язування з CD27 і експресію >1 мкг / мл.

На підставі відносної афінності зв'язування для CD27, виміряного методом ІФА, п'ятнадцять C2177 і одинадцять C2191 варіантів були відібрані для проведення експериментальної експресії і очищення. Експериментальна експресія проводилася в тимчасовому режимі в клітинах CHO-S в обсязі 750 мл. Зібрані супернатанти очищали хроматографією з білком A, і очищені білки оцінювали на афінність і функціональну активність.

Афінності варіантів людських моноклональних антитіл HFR C2177 вимірювали методом поверхневого плазмонного резонансу (SPR) з використанням матричної системи взаємодії білків ProteOn XPR36 (BioRad). Швидкості асоціації та дисоціації CD27 вимірювали для кожного

варіанту. Поверхню біосенсора отримували шляхом ковалентного приєднання козячого антилюдського антитіла IgG (Fc) до поверхні чіпа GLC (BioRad) з використанням інструкції виробника для амінзв'язуючого хімічного аналізу. Приблизно 5000 ОБ (одиниць відповіді) антитіла були іммобілізовані. Кінетичні експерименти проводилися при температурі 25 °C в робочому буферному розчині (ФСБ, 0,01 % P20, 0,01 % БСА). Серійні розведення 1:3 людського ECD CD27 готували починаючи з 300 нМ. Приблизно 350 ОБ моноклонального антитіла були отримані на кожному каналі сенсорного чіпа. Ізотіпічно подібний контроль антитіла іммобілізували і застосовували в якості еталонної поверхні. Після захоплення моноклонального антитіла проводили трихвилинну ін'єкцію (фаза асоціації) розчину в концентрації антигену 30 мкл / хв, потім – 10-хвилинну ін'єкцію проточного буферного розчину (фаза дисоціації). Поверхня датчика була регенована шляхом ін'єкції 0,85 % фосфорної кислоти зі швидкістю 100 мкл / хв. Дані обробляли на програмному забезпеченні приладу. Проводили подвійне еталонне віднімання даних, віднімаючи графіки, отримані при ін'єкції буфера, з еталонних графіків, отриманих при зв'язуванні 1:1 Langmuir з точною відповідністю. Результат для кожного моноклонального антитіла повідомляли у форматі K_a (швидкість асоціації), K_d (швидкість дисоціації), K_D (рівноважна константа дисоціації) і відсоток активності. Афіни варіантів C2177 HFR були аналогічними з материнським моноклональним антитілом M40, показуючи менш ніж трикратну зміну K_D для всіх варіантів. Аналогічно, афінності варіантів людських моноклональних антитіл HFR C2191 показали менш ніж двократну різницю з материнським моноклональним антитілом M41.

Біологічну активність варіантів HFR вимірювали методом їх інгібування CD70-опосередкованої індукції NFκB при проведенні аналізу репортерного гена люціферази. НЕК-клітини трансфікували з використанням вектора експресії люціферази pGL4-32-NFκB-Luc2 (Promega), що індукується NFκB, та плазміди експресії CD27 або порожнього вектора, і інкубували протягом ночі в середовищі експресії Freestyle (Gibco, # 12338). Наступного дня клітини поміщали в 96-лункові культуральні планшети по 40 мкл і 50000 клітин на лунку. Потім 40 мкл антитіл або контрольних розчинів додавали до клітин за допомогою серійного розведення 1:3, починаючи з 30 мкг / мл кінцевої концентрації в лунці і інкубували протягом від 1 до 2 годин. Протягом даної інкубації епісомні клітини CD70 готували для стимуляції. Скорочено, адгезивні клітини перерозчиняли з використанням стандартних методів культивування клітин і інкубували протягом 1 години з використанням мітоміцину с з концентрацією 25 мкг / мл, щоб зупинити ріст клітин. Після інкубації CD70 + клітини відмивали в середовищі, розбавляли і 40 мкл додавали при концентрації 10000 клітин на лунку. Планшети інкубували протягом ночі. Наступного дня реагент Steady Glo (Promega) був підготовлений відповідно до інструкцій виробника та доданий по 120 мкл в кожен лунку. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин при струшуванні. Люмінесценцію вимірювали за допомогою зчитувального пристрою Perkin Elmer Envision Reader. IC_{50} з варіантів C2177 HFR були аналогічні один одному і материнському моноклональному антитілу M40 в діапазоні від 0,11 нМ до 0,21 нМ. IC_{50} з варіантів C2191HFR були аналогічні один одному і материнському моноклональному антитілу M41 в діапазоні від 0,13 нМ до 1,3 нМ.

Розгляд афінності, біологічної активності та біофізичних властивостей призвів до вибору варіанту M69 C2177, що складається з варіабельних ділянок H28 (Пор. ід. №: 111) і L35 (Пор. ід. №: 82), варіанти M91 C2191, що складається з варіабельних ділянок H31 (Пор. ід. №: 131) та L42 (Пор. ід. №: 140), для дозрівання афінності. Огляд K_D , викид очистки, зв'язування з CD27 ECD для супернатантів клітинної культури ("ІФА"), а також інгібування (IC_{50}) з CD27-опосередкованого відповіді NFκβ CD70 для материнського M40 і його варіанту M69 HFR, а також для материнського M41 і його варіанту M91, наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

ІН білка	VH	VL	Протеон KD (нМ)	Вхід (мг)	Сигнал ІФА	NFκB IC_{50} (нМ)
C2177 материнського M40	H7	L18	0,96	не визначається	1,00	0,14
M69	H28	L35	0,77	10,08	1,09	0,11
C2191 материнського M41	H10	L20	10,3	не визначається	1,00	0,30
M91	H31	L42	7,9	5,64	1,09	0,28

ПРИКЛАД 8. ОПТИМІЗАЦІЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ М69 З С2177 НFR

М69 має афінність близько 1 нМ до людського ECD CD27 і містить однакову кількість CDR, як і С2177 і НFA материнського CD27М40. Оптимізація М69 включала безліч бібліотек для збільшення афінності та видалення сайтів РТМ, введених або ідентифікованих у процесі.

- 5 Як описано в прикладі 9, паралельний підхід до бібліотеки фагового дисплея для НFR і оптимізація С2177 ідентифікували відмінність в проліну в позиції 52а CDR-H2. Ця позиція не була рандомізована в проекті бібліотеки. Спільна структура Fab С2177 і С2191 з CD27 (приклад 5) вказує на те, що Р52а не залучений прямим чином у процес зв'язування з антигеном. Проте, мутація на цій позиції може змінити конформацію петлі CDR-H2 і сприяти більш оптимальним
- 10 взаємодіям оточуючих залишків D27 з CD27. Тому бібліотека була створена, щоб довільно урізноманітнити Р52а і його навколишні залишки Y52, G53 і D54 з використанням мутагенезу NNK (бібліотекаС27Н28L2). Також у другому шляху оптимізації мутація Y32 на F в CDR-L1 показала покращене зв'язування. Тому друга бібліотека була створена з довільною різноманітністю Y32 разом з різноманітністю в залишках Y30а, D30d, A50, які розташовуються в
- 15 тій же структурній площині, що і Y32 (бібліотека С27L35L2).

Крім того, була проведена оцінка петель CDR-H3 і CDR-L1 з використанням бібліотек обмеженої різноманітності. Таблиці 5 і 6 показують структуру даних бібліотек.

Таблиця 5

Проект дозрівання афінності з обмеженою різноманітністю для CDR-H3 (С27Н28L3)

Материнська амінокислота VH і позиція	Різниця
Ser95	A, S
Asp96	A, D
Tyr97	A, D, S, Y
Tyr98	A, D, S, Y
Gly99	A, G
Asp100	A, D
Tyr100a	A, D, S, Y
Gly100b	A, G
Phe100c	A, F, S, V
Ala101	A, G
Tyr102	A, D, S, Y

Таблиця 6

Проект дозрівання афінності з обмеженою різноманітністю для CDR-L1 (С27L35L3)

Материнська амінокислота VH і позиція	Різниця
Lys24	A, K, E, T
Ala25	A, G
Ser26	A, S
Gln27	A, Q, E, P
Ser28	A, S
Val29	A, V
Asp30	A, D
Tyr30a	A, D, S
Ala30b	A, G
Gly30c	A, G
Asp30d	A, D
Ser31	A, S
Tyr32	A, D, S
Met33	A, M, T, V
Asn34	A, N, D, T

20

Бібліотеки Fab були створені в системі pIX фагового дисплея Fab, як описано в патенті WO2009 / 085462, Shi et al, J Mol Biol 397: 385-396 (2010), and Tornetta et al. J Immunol Methods 360: 39-46 (2010) з внесенням мінімальних змін в сайти рестрикційних ферментів. Ці бібліотеки

поділяли методом пеннінгу щодо CD27-ECD у відповідності зі схемами пеннінга, відомими в даній галузі техніки, наприклад, такими як описано в патенті WO2009 / 085462 та в публікації Shi et al, J Mol Biol 397: 385-396 (2010), спрямованими на збільшення афінності методом вибору нижчої швидкості дисоціації або вищої швидкості асоціації. Фаги отримували за допомогою інфекції фага-помічника. Зв'язуючі фаги витягували шляхом додавання гранул з утворенням комплексу гранула / антиген / фаг. Після останнього відмивання фаг вивільняли шляхом інфікування експоненціально зростаючих клітин *Escherichia coli* TG-1. Фаг знову отримували і піддавали додатковим циклам пеннінга.

Для подальшого скрінінгу ДНК готували зі збережених в гліцерині циклів пеннінгу фагів, а ген pIX відокремлювали методом перетравлення NheI / SpeI. Після повторного лігування ДНК трансформували в клітини TG-1 і вирощували на планшетах LB / Agar протягом ночі. На наступний день збирали колонії, що виростили за ніч, і культури використовували (i) для проведення ПЛР колонії і секвенування V-ділянок, а також (ii) для індукції отримання Fab. Для отримання Fab що виросла за ніч, культуру розводили 10-100-кратно в новому середовищі і вирощували протягом 5-6 годин при 37 градусах С. Отримання Fab індукували шляхом додавання свіжої середовища, що містить IPTG, і культури вирощували протягом ночі при 30 градусах С. На наступний день культури облягали, а супернатанти, що містять розчинні Fab-білки, використовували для ІФА на Fab. Для проведення аналізу ІФА, розчинні Fab-білки захоплювали на планшети з допомогою поліклонального антитіла анти-Fd (CH1). Після відмивання і блокування додавали мічений біотином людський ECD CD27 в концентрації 0,2 нМ. Така концентрація дозволяє ранжувати Fab-варіанти, визначені як процентне відношення зв'язування материнського антитіла, причому визначено, що материнський Fab, що знаходиться в якості контролю на всіх планшетах, має 100 % зв'язування. Мічені біотином CD27 ECD виявляли стрептавідином, кон'югованим з HRP і аналізом хемілюмінесценції планшетів в спектрофотометрі. При такій концентрації CD27 можливо ранжування Fab-варіантів, нормалізованих до материнської Fab. За допомогою даного критерію були обрані 10 важких і 6 легких ланцюгів, що пов'язують людський CD27 на 100 % або більше відносно M69 Fab.

З бібліотеки CDR-H2 (C27H28L2) материнський Y переважно вибирали в положенні 52, що вказує на перевагу для цього залишку. У положенні 52a, Р був замінений на залишки A, S, V і G серед Fab з кращою активністю зв'язування. У положенні 53 був обраний материнський G разом з R і N. У положенні 54 відновлювали тільки материнський D. Дев'ять клонів з цієї бібліотеки (таблиця 7) субклонували в вектори IgG для експресії та характеристики як моноклональних антитіл.

Таблиця 7

Дев'ять VH клонів, вибраних з повної різноманітності бібліотеки C27H28L2

№ пептиду	Y52	P52a	G53	D54
H237	F	V	R	D
H238	Y	V	г	D
H239	Y	A	г	D
H240	Y	A	R	D
H241	Y	г	R	D
H242	Y	A	H	D
H243	Y	г	г	D
H244	Y	S	г	D
H245	Y	S	R	D

Єдиною різноманітністю, яку відновлювали для бібліотеки CDR-H3 (C27H28L3), була S95A і A101G. Один клон з цієї бібліотеки, що містить обидві мутації (таблиця 8), субклонували в вектори IgG для експресії та характеристики в якості моноклонального антитіла.

Таблиця 8

Єдиний VH клон, вибраний з C27H28L3

№ пептиду	S95	D96	Y97	Y98	G99	D100	Y100a	G100b	F100c	A101	Y102
H236	A	D	Y	Y	г	D	Y	г	F	г	Y

Для бібліотеки L-CDR1, що складається з чотирьох позицій (C27L35L2), положення 30a показало збагачення материнських Y і W. У положенні 30d, залишки S, H і E були збагачені разом з материнським D. У положенні 32 материнський Y був замінений на F і W. У положенні 50 було віддано перевагу T над материнським A. В цілому, кращі клони мали більш гідрофобні бокові ланцюги в порівнянні з материнськими. П'ять клонів з цієї бібліотеки (таблиця 9) субклонували в вектори IgG для експресії і характеристики в якості моноклональних антитіл.

Для повної бібліотеки CDR-L1 з обмеженим різноманітністю (C27L35L3) була відновлена тільки одна послідовність з єдиною відмінністю від материнської, оскільки Y32 був замінений на F, аналогічно VL бібліотеці з чотирма положеннями, що описана вище. Ця повна бібліотека CDR-L1 не включала F в положенні 32, і, таким чином, відновлений клон, найімовірніше є контоменантом з бібліотеки VL, що складається з чотирьох позицій. Цей клон (L255) субклонували в вектори IgG для експресії і характеристики в якості моноклонального антитіла (таблиця 9).

Таблиця 9

Шість VL клонів, вибраних з C27L35L1 і C27L35L2

№ пептиду	Y30a	D30d	Y32	A50
L255	Y	D	F	A
L256	Y	D	W	V
L257	Y	D	W	T
L258	Y	S	F	T
L260	W	H	W	T
L261	Y	S	F	E

6-варіантні легкі ланцюги були об'єднані в пари з 10-варіантними важкими ланцюгами, щоб отримати 60 комбінацій, які експресували клітини HEK293E. Супернатанти піддавали скринінгу на предмет рівня експресії, зв'язування з людським CD27 ECD, як було виміряно при проведенні аналізу ІФА, а також афінності, як було виміряно з використанням інструменту ProteOn. Рівень експресії всіх варіантів був достатнім для цілей проведення скринінгу. Для деяких варіантів афінність була збільшена до 40 разів. Два моноклональних антитіла M596 і M600 були відібрані для подальшого мутагенезу, щоб усунути можливі сайти пост-трансляційної модифікації. Комбінації ланцюгів VH і VL для цих моноклональних антитіл наведені в таблиці 10. Антитіла відрізняються тільки двома залишками в їхніх легких ланцюгах.

Таблиця 10

Об'єднання в пари важких і легких ланцюгів обраних дозрілих домінантів афінності C2177

Ідентифікатор антитіла	Ідентифікатор пептиду легкого ланцюга	CDR-L1 (Пор. ід. №)	CDR-L2 (Пор. ід. №)	Ідентифікатор пептиду важкого ланцюга	CDR-H2 (Пор. ід. №)
M596	L257	KASQSVDYAGDSWMN (26)	TASNLES (39)	H239	RIYAGDGDNTN (залишки 1-10 з 15)
M600	L255	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	H239	RIYAGDGDNTN (залишки 1-10 з 15)

M596 відрізняється від материнської молекули, M69, в трьох положеннях: P52aA в CDR-H2, Y32W в CDR-L1 і A50T в CDR-L2. M600 відрізняється від M69 в двох положеннях: Мутація P52aA в CDR-H2 і Y32F в CDR-L1.

Три розділені сайти потенційної післятрансляційної модифікації були визначені в M596 і M600. Існує потенційний N-пов'язаний сайт глікозилювання в положенні N58 в CDR-H2 і два потенційних сайти ізомеризації в CDR-H2 і CDR-L1, кодовані "DG" і "DS" відповідно. Крім того, M596 містить залишок триптофану HE зародкової лінії в CDR-L1, який може бути схильний до окислення.

- 3 метою усунення ризику глікозилювання були створені три окремі поодинокі заміни в N58 і одна в S60 (таблиця 11). Конструкти експресували в клітинах HEK293E, супернатанти оцінювали на афінність до CD27 з використанням інструменту ProteOn. Всі варіанти мали афінності, близькі до материнських, які становили 25 пМ і 49 пМ для M596 і M600 відповідно.
- 5 Варіанти M680 і M678, які обидва походять з M600, були відібрані для оцінки подальших заміщень з метою видалення сайтів ізомеризації. Варіанти M680 і M678 мають A в положеннях 60 і 58, відповідно і мають додаткову перевагу в нестачі триптофану в CDR-L1, який був присутній в материнському M596

Таблиця 11

Материнська амінокислота VH і позиція	Різноманітність
Asn58	N, A, R, T
Ser60	S, A

10

Для оцінки впливу мутації потенційних сайтів ізомеризації в M678 і M680 була розроблена невелика бібліотека, щоб паралельно видалити обидва сайти. Кожна мутація була замінена індивідуально на CDR-H2 важких ланцюгів або CDR-L1 загального легкого ланцюга, а потім об'єднана в пари в комбінаторній бібліотеці. Різноманітність цієї бібліотеки представлено в таблиці 12.

15

Таблиця 12

Материнська амінокислота VH і позиція	Різноманітність
Asp54	D, E
Gly55	G, A
Материнська амінокислота VL і позиція	Різноманітність
Asp34	D, E

20

Були експресовані дані моноклональні антитіла і була оцінена афінність як для варіантів сайтів глікозилювання. Мутація D34E в потенційному сайті ізомеризації CDR-L1 призвела до послідовного двократного збільшення афінності і, отже, цей сайт був успішно видалений.

Мутація D54E в потенційному сайті ізомеризації CDR-H2 знизил афінність більш ніж у десять разів. Однак, мутація G55A істотно не вплинула на афінність. Варіанти M703 і M706 зберігають афінність материнського M600 і мають знижений ризик впливу на функції з PTM. Таблиця 13.

25 показує обрані варіанти з кожної стадії оцінки PTM-ризиків, об'єднання в пари їх важких і легких ланцюгів, афінність і зміни послідовності в CDR. Мутація, обрана для видалення потенційного сайту глікозилювання, підкреслена. Мутації для видалення двох потенційних сайтів ізомеризації виділені жирним шрифтом і підкреслені подвійною лінією.

25

Таблиця 13

mAb ID	VH	VL	KD (пМ)	CDR-H2 (Пор. ід. №)	CDR-L1 (Пор. ід. №)
M596	H239	L257	25	RIYAGDGD ^{TT} NYSPSFQ ^{TT} G (165)	KASQSV ^{TT} DYAGDSWMN (26)
M600	H239	L255	49	RIYAGDGD ^{TT} NYSPSFQ ^{TT} G (165)	KASQSV ^{TT} DYAGDSFMN (25)
M678	H259	L255	53	RIYAGDGD ^{TT} TAYSPSFQ ^{TT} G (166)	KASQSV ^{TT} DYAGDSFMN (25)
M680	H260	L255	30	RIYAGDGD ^{TT} TNYAPSFQ ^{TT} G (167)	KASQSV ^{TT} DYAGDSFMN (25)
M703	H270	L267	28	RIYAGDAD ^{TT} TAYSPSFQ ^{TT} G (168)	KASQSV ^{TT} DYAG ^{TT} ESFMN (29)
M706	H272	L267	13	RIYAGDAD ^{TT} TNYAPSFQ ^{TT} G (169)	KASQSV ^{TT} DYAG ^{TT} ESFMN (29)

30

ПРИКЛАД 9. КОМБІНОВАНІ HFR І ОПТИМІЗАЦІЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ C2177

35

У цьому підході обмежений набір варіантів HFR оцінювали у форматі Fab на предмет експресії, відображення pIX і зв'язування, а потім найкращих кандидатів просували для оптимізації. CDR з C2177 були адаптовані до людських каркасних ділянок у дві важкі ланцюги VH5-51 (Пор. ід. №: 102 H24) і VH1-46 (Пор. ід. №: 106 H25) і дві легкі ланцюги Vk4-1 і Vk012 (Пор. ід. №: 90 L36). Ці варіабельні домени HFA були з'єднані попарно в матрицю 2 × 2 в якості Fabc людським CH1 і Ск константними ділянками у векторі дисплея фарів Fab pIX. Варіант VH1-46 / Vk012 (M55, H25 / L36) показав зв'язування з CD27 і добрі характеристики відображення і був обраний для створення бібліотек дозрівання афінності.

Бібліотеки Fab для відображення рІХ фагів були створені, як описано вище в прикладі 8. На основі експериментальних спільних структур CD27 з C2191 і C2177 (приклад 5), бібліотеки різноманітності були розроблені в залишках CDR в і навколо паратопов антитіл. Акцент на зміні був зроблений в CDR-L1, L3 і H2. У загальній кількості 4-6 залишків у межах окремого CDR були диверсифіковані з використанням кодону NNK, що кодує для всіх 20 амінокислот. Розмір кожної бібліотеки оцінювали в $\leq 6 \times 10^7$ варіантів, що може бути охоплено стандартними методиками рестрикційного клонування бібліотек. Таблиця 14 показує залишки, які були піддані повній диверсифікації в різних бібліотеках CDR.

Таблиця 14

Структура бібліотеки дозрівання афінності C2177

VH CDR	Материнська амінокислота і позиція
CDR-H2	Y52
	G53
	D54
	D56
	N58
CDR-H3	Y97
	Y98
	D100
	Y100a
VL CDR	Материнська амінокислота і позиція
CDR-L1	Y30a
	A30b
	G30c
	D30d
	Y32
CDR-L3	Q90
	N92
	E93
	D94
	Y96

10

15

20

25

30

Fab бібліотеки, які відображаються на білку ІХ оболонки фага, поділяли методом пеннінга на мічені біотином hCD27ECD / Fc. Фаг отримували з використанням інфекції фага-хелперу плазмідної бібліотеки варіантів. Сполучні фаги видобували шляхом додавання покритих стрептавідином магнітних гранул для створення комплексу гранула / антиген / фаг. Після останнього відмивання фаг вивільняли шляхом інфікування експоненціально зростаючих клітин *Escherichia coli* MC1061F. Фаг знову отримували і піддавали додатковим циклам пеннінгу. Розчинний Fab з обраних клонів був вироблений і оцінений на предмет активності зв'язування, як описано для шляху 1. Результати були отримані тільки з бібліотек CDR-L1 і CDR-L2. Двадцять один клон з цих двох бібліотек продемонстрував зв'язування більше, ніж у материнських HFR Fab. Клони, що містять С або М в найрізноманітніших послідовностях, були відбраковані. Десять Fab конвертували для експресії на тлі IgG4SPAAa / карра для подальшого дослідження. Важкий ланцюг IgG4PAA – це людський IgG4, що містить заміну серину на пролін в шарнірної області (Angal et al., Mol Immunol 30: 105 (1993) і заміни аланіну в двох позиціях в CH2 (ML Alegre et al, Transplantation; 57: 1537-43 (1994)). Моноклональні антитіла отримували в клітинах HEK293E в якості реплік Fab і у вигляді матриці з комбінацій важких і легких ланцюгів. Афінність вимірювали на приладі ProteOn з використанням культуральних супернатантів (таблиця 15). Мутація P52a на Q (M158) або S (M157) в CDR-H2 зменшила K_D в 6 разів у порівнянні з материнським моноклональним антитілом (M159). Мутація Y36F в CDR-L1 (M149) зменшила K_D в 4 рази, а додавання мутацій G33H і D34E (M155) призвело до 6-кратного зменшення K_D . Комбінація мутації P52S або з Y36F (M160), або з Y36F плюс G33H і D34E зменшила K_D в 20 разів до 100 пМ. Комбінації замін в M158, M160 і M166 були відібрані для подальшої характеристики.

Таблиця 15

Первісна панель моноклональних антитіл, яка походить з бібліотек мутації Fabs

ІН білка ДНК	H&L	CDR-H2 (Пор. ід. №)	CDR-L1 (Пор. ід. №)	K _D (нМ)
M149	H25, L219	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	0,54
M150	H25, L218	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFGDSL MN (32)	4,04
M151	H25, L224	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYNNSSFMN (36)	1,07
M152	H25, L223	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYWSDSF MN (35)	1,54
M153	H25, L222	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYVGT SF MN (34)	1,41
M154	H25, L221	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFRT SF MN (33)	1,56
M155	H25, L217	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAHES FMN (31)	0,37
M156	H25, L216	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFSES FMN (170)	0,71
M157	H197, L220	RIYQGDGDTNYNGKFKG (22)	KASQSVDYAGDSY MN (24)	0,39
M158	H196, L220	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAGDSY MN (24)	0,36
M159	H25, L220	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAGDSY MN (24)	2,23
M160	H196, L219	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAGDS FMN (25)	0,12
M161	H196, L218	RIYS GDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYF GDSL MN (32)	1,34
M162	H196, L224	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYNNSS FMN (36)	0,43
M163	H196, L223	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYWSDSF MN (35)	0,30
M164	H196, L222	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYVGT SF MN (34)	0,27
M165	H196, L221	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYFRT SF MN (33)	0,18
M166	H196, L217	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAHES FMN (31)	0,10
M167	H196, L216	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYFSES FMN (170)	0,91

- Білки M160 і M166 виробляли в 750 мл культури клітин HEK293, очищали й аналізували на кінетику зв'язування з CD27-His на апараті Biacore. Значення K_D були на 1 лог вище, ніж виміряні за допомогою апарату ProteOn у неочищених супернатантах, але показали однакові значення по відношенню один до одного (таблиця 16).

Таблиця 16

Ідентифікатор mAb	k _{в'имк.} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{в'имк.} (s ⁻¹)	K _D (пМ)
M158	(1,5±0,03) E+06	(6,6±1,7) E-04	439±114
M160	(1,6±0,15) E+06	(1,8±0,01) E-04	117±11
M166	(1,62±0,04) E+06	(2,03±0,16) E-04	126±11

- При повторній оцінці оригінальних комбінацій HFA, VH, адаптовані VH5-51, показали значення K_D в 2 рази менше значень каркаса VH1-46. Мутація P52aS в H-CDR2 була введена в VH5-51 VH для створення H221. H221 експресували легкі ланцюги L220, L219 і L217 з материнського моноклонального антитіла HFA (M159) і афінність поліпшила варіанти M160 і M166, відповідно, для отримання моноклональних антитіл M171, M169 і M170. Вимірювання кінетики за допомогою апарату Biacore на очищених моноклональних антитілах показали двократне поліпшення K_D порівняно з відповідними варіантами VH1-46 (порівняйте таблиці 16 і 17).

Таблиця 17

Ідентифікатор mAb	Ідентифікатор білка H / L	K _{увімк.} середн. (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{в'имк.} середн. (s ⁻¹)	K _D середн. (пМ)
M169	H221, L219	(1,48±0,13) E+06	(1,02±0,07) E-04	69±8
M170	H221, L217	1,66E+06	1,16E-04	70
M171	H221, L220	1,53E+06	3,58E-04	234

Аналіз послідовностей M160, M169 і M170 виявив потенційний сайт ізомеризації на D54-G55 і потенційний сайт дезамінування на N61-G62 в CDR-H2 з H196 і H221. Крім того, потенційний сайт ізомеризації був виявлений на D34 в CDR-L1 з L219. Мутації були введені з метою видалення цих сайтів і оцінені по їх впливу на активність (таблиця 18). Очищені моноклональні антитіла були проаналізовані на афінність до CD27-His на апараті ProteOn. Мутації або не мали взагалі ніякого ефекту, або не мали позитивного ефекту на K_D . Наприклад, як M668, так і M671 мали K_D майже в 2 рази нижче, ніж їхні материнські моноклональні антитіла, M160 і CM169 відповідно.

Таблиця 18

Варіанти моноклональних антитіл з мutowаними послідовностями PTM

Материнське моноклональних антитіл	Ідентифікатор mAb	Ідентифікатор білка H / L	CDR-H2 (Пор. ід. №)	CDR-L1 (Пор. ід. №)	$K_{увімк.}$ середн. ($M^{-1} s^{-1}$)	$K_{викл.}$ середн. (s^{-1})	K_D середн. (нМ)
M160	M160	H196, L219	RIYSGDGDYTN YNGKFKG (19)	KASQSVDY AGDSFMN (25)	2,07E+06	2,23E-04	108
M166	M166	H196, L217	RIYSGDGDYTN YNGKFKG (19)	KASQSVDY AHESFMN (31)	1,84E+06	2,34E-04	127
M169	M169	H221, L219	RIYSGDGDYTN YNGKFKG (19)	KASQSVDY AGDSFMN (25)	2,36E+06	1,39E-04	59
M160	M668	H255, L266	RIYSGDADTN YAQKFKG (20)	KASQSVDY AGESFMN (29)	2,14E+06	1,29E-04	60
M160	M669	H256, L266	RIYSGDADTN YNQKFKG (21)	KASQSVDY AGESFMN (29)	2,49E+06	1,45E-04	58
M169	M670	H257, L266	RIYSGDADTN YAQKFKG (20)	KASQSVDY AGESFMN (29)	1,73E+06	1,13E-04	65
M169	M671	H258, L266	RIYSGDADTN YNQKFKG (21)	KASQSVDY AGESFMN (29)	2,52E+06	9,73E-05	39
M166	M672	H255, L217	RIYSGDADTN YAQKFKG (20)	KASQSVDY AGESFMN (29)	1,83E+06	2,64E-04	144
M166	M673	H256, L217	RIYSGDADTN YNQKFKG (21)	KASQSVDY AGESFMN (29)	1,89E+06	1,89E-04	100

ПРИКЛАД 10. ОПТИМІЗАЦІЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ M91 ІЗ C2191 HFR

Методи, що застосовувались для оптимізації M91 (H31 / L42) були такими ж, як описано в прикладі 8, якщо не вказано інакше. Сканування аланіну / зародкової лінії CDR з C2191 проводилося у форматі Fab для оцінки позицій, важливих для взаємодії з CD27 з використанням материнських VH і VL ділянок C2191 у форматі Fab з константними людськими Ch1 і Ck ділянками. Бібліотеки замінювали залишки в CDR аланіном або залишком відповідної послідовності зародкової лінії. Деякі позиції в CDR були виключені, оскільки вони мали низьку ступінь прояву або не проявлялися під впливом розчинника при моделюванні, а потім на певній структурі (приклад 5). Передбачувані соматичні мутації мутували до первісного вигляду, до амінокислот мишачої зародкової лінії, для оцінки їх внеску в афінність антитіл. Скорочено, мишачі V ділянки клонували у вектор дисплея Fab pIX і було проведено тестування зв'язування материнського з міченим біотином людським білком CD27-ECD методом ІФА. Одиночні мутації (відповідно до проекту бібліотеки) були введені за допомогою мутагенезу, спрямованого на сайт, що було проведено відповідно до описаного в публікації Stratagene (La Jolla, CA, USA).

Мутантів з підтвердженими послідовностями ретельно відбирали на нові планшети і вирощували разом з материнським Fab і негативним контролем Fabs. Остаточні варіанти окремих амінокслотних замін були отримані в *E. coli*, а потім був проведений їх скринінг на експресію і зв'язування з CD27 методом ІФА. Сигнали експресії і зв'язування для материнських клонів були усереднені і встановлені на 1,0, а сигнали мутантів були нормалізовані щодо материнських. Дві форми антигену використовували при проведенні аналізів методом ІФА: CD27 ECD (залишки 1-173) і химеру CD27 ECD-Fc (R&D Systems).

Результати цього сканування в поєднанні з спільною кристалічною структурою стали основою для проектування бібліотек дозрівання афінності. Для важкого ланцюга; позиції, вибрані для зміни були наступними: T33 в H-CDR1 і Y50, S52, S52a N56 і Y58 в CDR-H2 (таблиця 23). T33 не є контактним залишком, але мутація T33A поліпшила зв'язування. Позиції S52 і S52A не є контактними залишками, але заміни в скануванні показали деяке підвищення зв'язування. Тирозини в положеннях 50 і 58 є контактними сайтами і заміни на цих сайтах були обрані в паралельному шляху оптимізації, опис в прикладі 11. Позиція N56 не була оцінена в скануванні аланіна / зародкової лінії, але вона є контактним сайтом і прилягає до T33, S52 і S52a в кристалічній структурі. Для легкого ланцюга були обрані наступні позиції для зміни: 30a, S30b, G30c і Y30d в CDR-L1 і L50 і N53 в CDR-L2 (таблиця 23). Жоден з цих залишків не контактує з антигеном безпосередньо, але вони примикають до контактуючих залишків, які, як показало сканування, мають істотний негативний вплив на зв'язування. Мутація L50A мала помірну дію на зв'язування і в кристалічній структурі є єдиним залишком в CDR-L2, який, можливо, контактує з антигеном. Крім того, N53 був обраний для обмеженої диверсифікації. Були створені дві паралельні бібліотеки, одна з Y30d, що мутує до W, і інша з Y30d, який зберігся як Y, так який W може зробити паратоп більш гідрофобним і, отже, менш здатним до прояву. Таблиці 19 і 20, наведені нижче, показують проекти бібліотек дозрівання афінності VH і VL для M91.

Таблиця 19

2191	HC_CDR1	HC_CDR2				
Контакт з антигеном?	HI	TAK	HI	HI	TAK	TAK
Положення в важкого ланцюга (SEQ ID NO: 131)	T33	Y50	S52	S52a	N56	Y58
Положення в важкого ланцюга (SEQ ID NO: 131)	T33	Y50	S52	S53	N57	Y59
Диверсифікація послідовності	Всі 20 амінокислот	Y	Всі 20 амінокислот	Всі 20 амінокислот	Всі 20 амінокислот	Y
		A				I
		W				L
		H				W

Таблиця 20

2191	LC_CDR1				LC_CDR2	
Контакт з антигеном	HI	HI	HI	TAK	TAK	HI
Положення в LC (Пор. ід. №: 140)	T30a	S30b	G30c	Y30d	L50	N53
Положення LC (Пор. ід. №: 140)	T31	S32	G33	Y34	L54	N57
Диверсифікація послідовності	Всі 20 амінокислот	Всі 20 амінокислот	г	Y*	Всі 20 амінокислот	H
			R	W*		K
						R

* Були створені дві окремі бібліотеки, що містять або Y, або W в даній позиції

Fab бібліотеки, які відображаються на білку IX оболонки фага, поділяли методом пеннінга на мічені біотиліном CD27-ECD. Було відібрано всього 12 варіантів важких і 12 варіантів легких ланцюгів, які пов'язувалися з CD27 в тій же мірі або краще, ніж материнський химерний Fab з C2191. Варіанти були перетворені в IgG1 / карма антитіла, що виробляються в клітинах

НЕК293Е у вигляді 144 комбінацій і супернатанти культури оцінювали на предмет зв'язування з використанням ProteOn. Для деяких варіантів спостерігалися значні (100-кратні) збільшення афінності. З 144 пар VH і VL для додаткової характеристики були обрані 8 (таблиця 21). Ці моноклональні антитіла були розділені на три підгрупи. Варіанти з групи 1, які мають один і той же важкий ланцюг (H227, Пор. ід. №: 133), об'єднували в пари з чотирма різними легкими ланцюгами, в той час як варіанти групи 2 і групи 3, кожна з яких має по одному легкому ланцюгу, об'єднували в пари з двома різними важкими ланцюгами. Чотири вибрані легкі ланцюги змінювалися на всіх чотирьох позиціях, диверсифікованих в CDR-L1 (RASKSVSX₁ × ₂ X₃ × ₄ SFMH) (Пор. ід. №: 158); де X₁ -це A, E, H або L; X₂ -це D, G, V або W; X₃ -це G або R; і X₄ -це W або Y). Вони також змінювалися в обох позиціях, диверсифікованих в CDR-L2 (X₁ASX₂LES) (Пор. ід. №:171); де X₁ -це L або V; і де X₂ -це K, N або R). CDR-L3 не був змінений з послідовності L42 (Пор. ід. №: 140) і являє собою QHSRELPWT.

Таблиця 21

Об'єднання попарно послідовностей важких і легких ланцюгів з обраних 2191 дозрілих домінантів

Афінності дентифікатор антитіла	Ідентифікатор пептиду легкого ланцюга	CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	Ідентифікатор пептиду важкого ланцюга	CDR-H1 (Пор. ід. №:)	CDR-H2 (Пор. ід. №:)
M427	C27L244	RASKSVSAW GYSFMH (60)	VASRLE S (68)	C27H227	GFTFSSY GMS (44)	YIDEGGGQ TIYPDSVKG (47)
M429	C27L245	RASKSVSHV RWSFMH (61)	LASKLE S (69)	C27H227	GFTFSSY GMS (44)	YIDEGGGQ TIYPDSVKG (47)
M488	C27L249	RASKSVSEG RWSFMH (62)	VASRLE S (68)	C27H227	GFTFSSY GMS (44)	YIDEGGGQ TIYPDSVKG (47)
M489	C27L250	RASKSVSLD RWSFMH (63)	LASNLE S (67)	C27H227	GFTFSSY GMS (44)	YIDEGGGQ TIYPDSVKG (47)
M492	C27L249	RASKSVSEG RWSFMH (62)	VASRLE S (68)	C27H228	GFTFSSY SMS (45)	YIDAGGGFT IYPDSVKG (48)
M493	C27L250	RASKSVSLD RWSFMH (63)	LASNLE S (67)	C27H228	GFTFSSY SMS (45)	YIDAGGGFT IYPDSVKG (48)
M501	C27L250	RASKSVSLD RWSFMH (63)	LASNLE S (67)	C27H231	GFTFSSY SMS (45)	HIDAGGGR TWYPDSVK G (49)
M526	C27L249	RASKSVSEG RWSFMH (62)	VASRLE S (68)	C27H222	GFTFSSY GMS (44)	YIDRGGGV IYPDSVKG (50)

Ці вісім варіантів були отримані шляхом тимчасової експресії в клітинах НЕК293Е в обсязі 750 мл. Зібрані супернатанти очищали за допомогою хроматографії білка А і кожен варіант аналізували з використанням методу SDS-PAGE та ексклюзійної хроматографії для визначення чистоти зразка та процентного вмісту мономеру в очищеній пробі. Всі варіанти мали значення чистоти більше ніж 90 % і значення вмісту мономерів таке було більше ніж 90 %. Для оцінки властивостей асоціації антитіл, утримуючі фактори (k') були визначені шляхом виконання перехресного взаємодії хроматографії для кожного очищеного варіанта (Jacobs SA, Wu SJ, Feng Y, Bethea D& O'Neil KT (2010) Cross-interaction chromatography: a rapid method to identify highly soluble monoclonal antibody candidates. Pharm Res 27, 65-71). У цьому способі зразок антитіл пропускали через колонку в поєднанні з людським IgG і оцінювали на предмет утримування в порівнянні з контрольними антитілами. Коротко, 50 мг людського IgG (Sigma Aldrich) з'єднували з колонкою NHS-сефароза об'ємом 1 мл (GE Healthcare) відповідно до інструкцій виробника. Незв'язаний IgG видаляли шляхом відмивання 0,1 M Tris, pH 8, 0,5 M

NaCl, а групи NHS, що не прореагували, блокували тим же буферним розчином. Ефективність зв'язування визначали шляхом вимірювання концентрації білка, що залишився в буфері для зв'язування речовини, що не прореагувала, і змивах, з використанням набору Coomassie Plus Assay Kit (Thermo Pierce) і віднімання цього значення з кількості білка до іммобілізації.

- 5 Контрольну колонку також отримували з використанням того ж протоколу, але без кон'югації IgG до смоли. Контрольну колонку спочатку обробляли на приладі для BPERX Dionex UltiMate 3000 після досягнення рівноваги в умовах ФБС, pH 7 та при швидкості потоку 0,1 мл / хв. Спочатку на колонку наносили 20 мкл маточного розчину білка, щоб забезпечити блокування неспецифічних сайтів зв'язування, після чого наносили 20 мкл 10 % ацетону для перевірки цілісності колонки.
- 10 Зразки для аналізу розводили до концентрації 0,1 мг / мл у ФСБ, pH 7. 20 мкл кожного зразка наносили на кожну колонку і залишали для обробки зі швидкістю 0,1 мл / хв протягом 30 хв. Реєстрували час утримання і для кожного варіанту розраховували коефіцієнт утримання (k'). Значення k розраховували як різницю часу утримування на колонці з IgG і порожній колонці. Всі варіанти очищали до досягнення чистоти більш ніж 90 % на основі SDS-PAGE та ексклюзивної хроматографії. Всі значення k розраховували так, щоб вони були меншими, ніж 0,3, що свідчить
- 15 про добрі властивості розчину (таблиця 22).

Таблиця 22

Аналіз серії очищених дозрілих варіантів

афінностідентифікатор антитіла	HC	LC	Конц. (мг / мл)	Відновлення загального білка	Мономер, %	гель	k'
M427	H227	L244	1,42	15,63	100	ок	0,02
M429	H227	L245	0,97	10,21	100	ок	0,07
M488	H227	L249	2,00	27,06	98,9	ок	0,07
M489	H227	L250	1,59	23,03	100	ок	0,17
M492	H228	L249	2,07	27,96	97,4	ок	0,25
M493	H228	L250	0,58	8,12	100	ок	0,24
M501	H231	L250	2,01	26,08	100	ок	0,28
M526	H222	L249	0,90	10,74	100	ок	0,10

- 20 Вісім різних моноклональних антитіл і материнський HFR були оцінені на предмет їх афінності до CD27 ECD з використанням BIAcore, а також їх IC₅₀ в аналізі кβ-репортера. Кінетичні константи і афінність вимірювали з використанням BIAcore. у таблиці 23 узагальнені дані, зібрані за цими варіантами. Сигнал експресії та ІФА на зв'язування з CD27 відповідно до вимірів від початкових малих супернатантів культури також включені в цю таблицю.

25

Таблиця 23

Зведені дані підмножин бібліотеки C2191 AM

Ідентифікатор білка	Експресія (мкг / мл)	сигнал ІФА	NFκβ IC ₅₀ (пМ)	k _a	k _d	K _D (ПМ)
M41	не визначається	не визначається	45	6,20E+05	8,44E-03	13650
M427	14,6	0,93	19	7,18E+05	3,00E-05	41,7
M429	16,1	0,86	42	6,62E+05	2,02E-05	30,4
M488	20,7	0,92	23	1,01E+06	3,96E-05	39,4
M489	24,2	0,96	41	9,06E+05	2,18E-05	24,1
M492	20,1	0,77	15	1,03E+06	1,47E-04	142,0
M493	24,5	0,85	14	7,23E+05	1,05E-04	145,0
M501	30,9	0,77	4	8,31E+05	6,16E-05	74,2
M526	14,3	0,69	6	1,00E+06	1,71E-04	171,0

ПРИКЛАД 11. КОМБІНОВАНИЙ HFR І ОПТИМІЗАЦІЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ C2191

У цьому підході обмежений набір варіантів HFR оцінювали у форматі Fab на предмет експресії, дисплея рІХ і зв'язування, а потім найкращих кандидатів просували для оптимізації. CDR з C2191 були адаптовані до людської каркасної ділянки в два важкі ланцюги (VH3-23 і VH3-11) і дві легкі ланцюги (Vk4-1 і Vk012). Ці варіабельні домени HFA були з'єднані попарно в матрицю 2 × 2 в якості Fabс з людськими CH1 і Ск константними ділянками у векторі дисплея фагів Fab рІХ. Варіант VH3-23 / Vk012 (H39 (Пор. ід. №: 145)) і L40 (Пор. ід. №: 137) показав зв'язування з CD27 і добрі характеристики відображення і був обраний для створення бібліотек дозрівання афінності. Цей Fab називається "материнським".

Для вибору антитіл з поліпшеною афінністю, кілька залишків у всіх CDR, крім CDR-H3 з H39, були повністю диверсифіковані за допомогою вироджених кодонів NNK (таблиця 24). Кожна бібліотека CDR створювалася окремо і піддавалася фаговому розділенню методом пеннінгу для вибору дозрілих варіантів афінності.

Таблиця 24

Проект бібліотеки дозрівання афінності для варіантів C2191

VH CDR	Материнська амінокислота і позиція
CDR-H2	Y50
	S52
	S53
	N56
	Y58
CDR-H3	H95
	R96
	G97
	N98
	P99
VL CDR	Материнська амінокислота і позиція
CDR-L1	T30a
	S30b
	G30c
	Y30d
	F32
CDR-L2	L50
	A51
	S52
	N53
	L54
	E55
	S56
CDR-L3	H90
	R92
	E93
	L94
	Y96

Бібліотеки C2191 з різноманітністю в CDR-H2, CDR-L1 або CDR-L2 випустили 50 унікальних Fab з поліпшеним зв'язуванням з людським CD27 щодо материнського HFR Fab, як виміряно методом ІФА по одній точці. Дані клони потім розділили за рангами по декількох точках методом ІФА і було вибрано сімнадцять клонів для конвертації на людський IgG4alaala / карма для подальшої характеристики (таблиця 25).

Fab з дозрілою афінністю, вибрані для конвертації на IgG

Ідентифікатор Fab	Ідентифікатор білка HC	Ідентифікатор білка LC	CDR-H2 (Пор. ід. №:)	CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)
Материнський	H39	L40	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F116	H39	L59	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	VGNRLED (70)
F119	H39	L62	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	VGDRRQ E (71)
F178	H145	L40	YISGGGGQTLYPD SVKG (54)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F18	H40	L40	AIDHGGGRTYYPD SVKG (51)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F19	H41	L40	AIDHGGGRTWYPD SVKG (52)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F243	H39	L124	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	VGSRMAF (72)
F250	H39	L131	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	VGDRAN W (73)
F256	H39	L137	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	VGSRLDY (74)
F279	H39	L160	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSYVRWSF MH (64)	LASNLES (67)
F291	H39	L172	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSHIRWSF MH (65)	LASNLES (67)
F292	H39	L173	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSHVRWSF MH (61)	LASNLES (67)
F295	H39	L176	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	VADRV EV (173)
F297	H190	L40	TIDRGGGGSTWYPD SVKG (55)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F298	H191	L40	AIDGGGGATYYPD SVKG (56)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F299	H192	L40	VIDHGGGGSTHYPD SVKG (57)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)
F302	H39	L179	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	RASKSVSLIRWSF MH (172)	LASNLES (67)
F57	H79	L40	AIDHGGGGQTLYPD SVKG (53)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)

Моноклональні антитіла IgG1 / k mAbs були створені у вигляді реплік Fabs і у вигляді матриці варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів (таблиця 26), а також протестовані на предмет афінності і властивостей розчину. Форма моноклонального антитіла материнського Fab позначається як M131. M141 і M408 були обрані для подальшої характеристики.

Таблиця 26

Моноклональні антитіла, отримані з дозрівання афінності Fab

Ідентифікатор Fab	Ідентифікатор mAb	H& Ідентифікатор білка L
Материнський	M131	H39, L40
F18	M132	H40, L40
F57	M133	H79, L40
F298	M134	H191, L40
F299	M135	H192, L40
F292	M136	H39, L173
F279	M137	H39, L160
F256	M138	H39, L137
Комбінація	M139	C27H40, L173
Комбінація	M140	C27H40, L160
Комбінація	M141	C27H79, L173
Комбінація	M142	C27H79, L160
Комбінація	M143	C27H191, L160
Комбінація	M144	C27H191, L173
Комбінація	M145	C27H192, L173
Комбінація	M146	H192, L160
Комбінація	M408	H192, L137

ПРИКЛАД 12. ХАРАКТЕРИЗАЦІЇ МОНОКЛОНАЛЬНИХ ТІЛ З ДОЗРІЛОЮ АФІННІСТЮ

- 5 Вибрані моноклональні антитіла з дозрілої афінністю, отримані з материнських C2177 і C2191 антитіл гібридом, оптимізували кодоном, вводили в інший вектор для досягнення подвійної експресії важких і легких ланцюгів, що експресуються в клітинній культурі CHO-GS, а потім очищали для подальшої характеристики. Ідентифікатори цих антитіл відносно зрілих варіантів, описаних у наведених вище прикладах, показані в таблиці 27.

Таблиця 27

Р материнський	Ідентифікатор пДНК	Ідентифікатор одиничного гена ДНК	Ідентифікатор пептиду LLC	Ідентифікатор пептиду HNC
C2191	M429	M696	C27L245	C27H227
C2191	M492	M695	C27L249	C27H228
C2191	M488	M694	C27L249	C27H227
C2191	M141	M707	C27H79	C27L173
C2191	M408	M708	C27H192	C27L137
C2177	M703	M709	C27H270	C27L267
C2177	M706	M710	C27H272	C27L267
C2177	M671	M711	C27H258	C27L266
C2177	M668	M713	C27H255	C27L266

10

- 15 Узагальнені дані для цих моноклональних антитіл наведені нижче для аналізу K_D з використанням Biacore і IC_{50} виміряно при проведенні аналізу репортерного гена NF- κB (таблиці 28 і 29). Для даного аналізу репортерного гена NF- κB клітини HEK-293F трансфекували в цілому 36 нг ДНК, що містить як конструкти людського CD27, так і конструкт люціферази під контролем промотора NF- κB . Трансфектанти HEK-293F висівали при концентрації 5×10^4 клітин на лунку і в 40 мкл середовища Freestyle (Gibco) на 96-лункові планшети. Розчини гібридомних антитіл анти-CD27 додавали на аналітичний планшет в середовищах Freestyle для кінцевої концентрації 50 мкг / мл з розведенням у співвідношенні 1:3 і планшети інкубували при температурі 37 °C (5 % CO₂) протягом 1 години. Для тестування здатності моноклональних антитіл нейтралізувати сигналізування CD70:CD27, додавали тимчасово опромінені (4000 рад) епісомальної клітини HEK-293E CD70 при концентрації 20 % від кількості трансфектантних клітин на планшет. Для тестування агоністичної активності гібридомних моноклональних антитіл, додавання епісомальної клітин CD70 HE проводилось. Аналітичні планшети інкубували
- 20

протягом ночі при температурі 37 °C (5 % CO₂) і проявляли з використанням системи для аналізу люціферази Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega) відповідно до інструкцій виробника.

Таблиця 28

Характеризація зрілих варіантів, отриманих з C2191

МКАТ	k _a (1 / Mc)	k _d (1 / c)	K _D (ПМ)	Аналіз NF-κβ IC ₅₀ (пМ)
материнська химера C2191 (M41)	4,35E+05	0,0103	23678	2300
M694	4,80E+05	7,60E-05	105	420
M695	5,10E+05	1,70E-04	202	250
M696	3,70E+05	2,1E-05	57	330
M707	5,85E+05	1,24E-04	213	260
M708	6,430E+05	2,25E-04	350	260

5

Таблиця 29

Характеризація зрілих варіантів, отриманих з C2177

мкАТ	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (нМ)	NF-κβАналіз IC ₅₀ (рМ)
материнська химера C2177 (M40)	1,06E+06	1,32E-03	1240	466
M709	2,30E+06	5,89E-05	26	272
M710	2,55E+06	4,88E-05	19	320
M711	1,97E+05	5,82E-05	30	258
M713	2,06E+05	1,16E-05	56	296

Послідовності CDR і V ділянок

Таблиця 30

2177 шлях 1

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Кабат	Кабат	Кабат
H7	M40 материнський	SSWMN (1)	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	SDYYGDYGFAY (23)
		Розширений CDR-H1	Кабат-7 (+2 HFR залишки для демонстрації мутацій PMT)	Кабат
H28	HFR(M69)	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDTNYS (4)	SDYYGDYGFAY (23)
H236		GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDTNYS	ADYYGDYGFY (162)
H237		GYAFSSSWMN (2)	RIFVRDGDTNYS (5)	SDYYGDYGFAY (23)
H238		GYAFSSSWMN (2)	RIYVGDGDTNYS (6)	SDYYGDYGFAY (23)
H239	M596, M600	GYAFSSSWMN (2)	RIYAGDGDTNYS (7)	SDYYGDYGFAY (23)
H240		GYAFSSSWMN (2)	RIYARDGDTNYS (8)	SDYYGDYGFAY (23)
H241		GYAFSSSWMN (2)	RIYGRDGDTNYS (9)	SDYYGDYGFAY (23)
H242		GYAFSSSWMN (2)	RIYANDGDTNYS (10)	SDYYGDYGFAY (23)
H243		GYAFSSSWMN (2)	RIYGGDGDTNYS (11)	SDYYGDYGFAY (23)
H244		GYAFSSSWMN(2)	RIYSGDGDTNYS (12)	SDYYGDYGFAY (23)
H245		GYAFSSSWMN (2)	RIYSRDGDTNYS (13)	SDYYGDYGFAY (23)
H259	M678	GYAFSSSWMN (2)	RIYAGDGDTAYS (14)	SDYYGDYGFAY (23)
H260	M680	GYAFSSSWMN (2)	RIYAGDGDTNYA (15)	SDYYGDYGFAY (23)
H270	M703=M709	GYAFSSSWMN (2)	RIYAGDADTAYS (16)	SDYYGDYGFAY (23)
H272	M706=M710	GYAFSSSWMN (2)	RIYAGDADTNYA (17)	SDYYGDYGFAY (23)
			RIX ₁ × ₂ X ₃ DX ₄ DTX ₅ YX ₆ (151)	

Для послідовності Пор. ід. №:151, X_1 являє собою F або Y; X_2 являє собою A, G, S АБО V; X_3 являє собою G, N або R; X_4 являє собою A або G; X_5 являє собою A або N; а X_6 являє собою A або S

5

Таблиця 31

2177 шлях 2

VH		CDR-H1 (Пор. ід. №:)	CDR-H2 (Пор. ід. №:)	CDR-H3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
H7	M40 материнський	SSWMN (1)	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	SDYYGDYGFAY (23)
		Розширений CDR-H1	Kabat-7 (CDR, що залишився, однаковий в мишачому варіанті і HFR)	Кабат
H24	HFR(M50)	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDTNYNGKFKG (18)	SDYYGDYGFAY (23)
H221	M169, M170, M171	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	SDYYGDYGFAY (23)
H257	M670	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	SDYYGDYGFAY (23)
H258	M671=M711	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	SDYYGDYGFAY (23)
H25	HFR (M55); M149-156; M159	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDTNYNGKFKG (18)	SDYYGDYGFAY (23)
H196	M158; M160-167	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	SDYYGDYGFAY (23)
H255	M668=M713; M672;	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	SDYYGDYGFAY (23)
H256	M669; M673	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	SDYYGDYGFAY (23)
H197	M157	GYAFSSSWMN (2)	RIYQGDGDTNYNGKFKG (22)	SDYYGDYGFAY (23)
			RIYX ₁ GDX ₂ DTNYX _{3×4} KFKG(152)	

Для послідовності Пор. ід. №: 152, X_1 являє собою P, Q або S; X_2 являє собою A або G; X_3 являє собою A або N; X_4 являє собою G або Q.

Таблиця 32

2177 шлях 1

VL		CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	CDR-L3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
L18	M40 материнський мишачий	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L35	HFR (M69)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L255	M600; M678; M680	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L256		KASQSVDYAGDSWMN (26)	VASNLES (38)	QQSNEDPYT (41)
L257	M596	KASQSVDYAGDSWMN (26)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L258		KASQSVDYAGSSFMN (27)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L260		KASQSVDWAGHSWMN (28)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L261		KASQSVDYAGSSFMN (27)	EASNLES (40)	QQSNEDPYT (41)

10

VL		CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	CDR-L3 (Пор. ід. №:)
L267	M703=M709; M706=M710	KASQSVDYAGESFMN (29)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
		KASQSVDX ₁ AGX ₂ SX ₃ MN (153)	X ₁ ASNLES (154)	

Для послідовності Пор. ід. №: 153, X₁ являє собою W або Y; X₂ являє собою D, E, S або H; X₃ являє собою F, W або Y.

Для послідовності Пор. ід. №: 154, X₁ являє собою A, E, T або V;

5

Таблиця 33

2177 шлях 2

VL		CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	CDR-L3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
L18	M40 материнський мишачий	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L36	HFR (M55; M50)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L216	M156; M167	KASQSVDYFSESYMN (30)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L217	M155; M166; M170; M672; M673	KASQSVDYAHESFMN (31)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L218	M150; M161	KASQSVDYFGDSLMM (32)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L219	M149; M160; M169	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L266	M668=M713; M669; M670; M671=M711;	KASQSVDYAGESFMN (31)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L220	M157; M171; M158; M159	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L221	M154	KASQSVDYFRTSFMN (33)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L222	M153	KASQSVDYVGTSMN (34)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L223	M152; M163	KASQSVDYWSDSFMN (35)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L224	M151; M162	KASQSVDYNNSSFMN (36)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
		KASQSVDYX ₁ × X ₂ MSX ₄ MN (155)		

Для послідовності Пор. ід. №: 155, X₁ являє собою A, F, V, W або Y; X₂ являє собою G, H, N, R або S; X₃ являє собою D, E, S або T; X₄ являє собою F, L або Y.

Таблиця 34

2191 шлях 1

VH		CDR-H1 (Пор. ід. №:)	CDR-H2 (Пор. ід. №:)	CDR-H3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
H10	M41 материнський	SYTMS (42)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
		Розширений CDR-H1	Кабат	Кабат
H31	HFR (M91)	GFTFSSYTMS (43)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
H227	M427, M429=M696; M488=M694; M489	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSVKG (47)	HRGNPFDY (58)

10

VH		CDR-H1 (Пор. ід. №:)	CDR-H2 (Пор. ід. №:)	CDR-H3 (Пор. ід. №:)
H228	M492=M695; M493	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPDSVKG (48)	HRGNPFDDY (58)
H231	M501	GFTFSSYSMS (45)	HIDAGGGRTWYPDSVKG (49)	HRGNPFDDY (58)
H222	M526	GFTFSSYGMS (44)	YIDRGGGVTIYPDSVKG (50)	HRGNPFDDY (58)
H227	Півний Кабат CDR-H1	SYGMS (161)		
			X ₁ IX _{2×3} GGGX ₄ TX ₅ YPDSVKG (156)	

Для послідовності Пор. ід. №: 156, X₁ являє собою Н або Y; X₂ являє собою D або S; X₃ представляє собою А, Е, R или S; а X₄ являє собою I, W або Y.

Таблиця 35

2191 шлях 2

VH		CDR-H1 (Пор. ід. №:)	CDR-H2 (Пор. ід. №:)	CDR-H3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
H10	M41 материнський	SYTMS (42)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDDY (58)
		Розширений CDR-H1	Кабат	Кабат
H39	HFR; M131; M136-138	GFTFSSYTMS (43)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDDY (58)
H40	M132; M139; M140	GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGRTYYPDSVKG (51)	HRGNPFDDY (58)
H41		GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGRTWYPDSVKG (52)	HRGNPFDDY (58)
H79	M133; M141=M707; M142	GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGQTLYPDSVKG (53)	HRGNPFDDY (58)
H145		GFTFSSYTMS (43)	YISGGGGQTLYPDSVKG (54)	HRGNPFDDY (58)
H190		GFTFSSYTMS (43)	TIDRGGGSTWYPDSVKG (55)	HRGNPFDDY (58)
H191	M134; M143; M144;	GFTFSSYTMS (43)	AIDGGGGATYYPDSVKG (56)	HRGNPFDDY (58)
H192	M135; M145; M146; M408=M708	GFTFSSYTMS (43)	VIDHGGGSTHYPDSVKG (57)	HRGNPFDDY (58)
			X ₁ IX _{2×3} GGGX ₄ TX ₅ YPDSVKG (157)	

5

Для послідовності Пор. ід. №: 157, X₁ являє собою А, Т, V або Y; X₂ являє собою D або S; X₃ являє собою G, H, R або S; X₄ являє собою А, N, Q, R або S; а X₅ являє собою H, L, W або Y.

Таблиця 36

2191 шлях 1

VL		CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	CDR-L3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
L20	M41 материнський мишачий	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L42	HFR (M91)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)

VL		CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	CDR-L3 (Пор. ід. №:)
L244	M427	RASKSVSAWGYFSMH (60)	VASRLS (68)	QHSRELPWT (75)
L245	M429=M696	RASKSVSHVRWSFMH (61)	LASKLES (69)	QHSRELPWT (75)
L249	M488=M694; M492=M695; M526	RASKSVSEGRWSFMH (62)	VASRLS (68)	QHSRELPWT (75)
L250	M489; M493; M501	RASKSVSLDRWSFMH (63)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
		RASKSVSX ₁ × ₂ X ₃ × ₄ SFMH (158)		

Для послідовності Пор. ід. №: 158, X₁ являє собою A, E, H, L, T або Y; X₂ являє собою D, G, I, S, V або W; X₃ являє собою G або R; а X₄ являє собою W або Y.

5

Таблиця 37

2191 шлях 2

VL		CDR-L1 (Пор. ід. №:)	CDR-L2 (Пор. ід. №:)	CDR-L3 (Пор. ід. №:)
		Кабат	Кабат	Кабат
L20	M41 материнський мишачий	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L59		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGNRLD (70)	QHSRELPWT (75)
L62		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRRQE (71)	QHSRELPWT (75)
L124		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSMAF (72)	QHSRELPWT (75)
L131		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRANW (73)	QHSRELPWT (75)
L137	M138; M408=M708	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRLDY (74)	QHSRELPWT (75)
L160	M137; M160; M142; M143; M146	RASKSVSYVRWSFMH (64)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L172		RASKSVSHIRWSFMH (65)	LASNLES	QHSRELPWT (75)
L173	M136; M139; M141=M707; M144; M145	RASKSVSHVRWSFMH (66)	LASNLES	QHSRELPWT (75)

Послідовності варіабельних областей білків та антитіл

Таблиця 38

Под. ід. №	Клон	Послідовність (послідовності CDR підкреслені)	Характеристики чи походження	Коментарі
174	Людський CD27 ECD	TPAPKSCPERHYWAQGLCCQMCEPGTFLV KDCDQHRKAAQCDCIPGVSFDPDHHTRPHC ESCRHCNSGLLVNCTITANAECACRNGWQC RDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPT HLPYVSEMLEARAGHMQLADFRQLPARTL STHWPPQRSCLSSDFIRILHHHHHH	ECD: 1-173, His6	

10

Под. ід. №	Клон	Послідовність (послідовності CDR підкреслені)	Характеристики чи походження	Коментарі
175	Людський CD27 без ECD	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLV KDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRP CESCRHCNSGLLVNRNCTITANAECACRNGW QCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQ LEVLFGQPHHHHHH	ECD: 1-121, cleavage site, His6	
176	Людський CD27 без ECD	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLV KDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRP CESCRHCNSGLLVNRNCTITANAECACRNGW QCRDKECTECDGGHHHH	ECD:1-101	Proteos
150	Людський CD70 ECD	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRALVPLVAGLVI CLVVCIQRFQAQAQQQLPLESLGWDVAELQLN HTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELKD GQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHP TTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRL TPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQ WVRP	ECD	
76	C2186варіабельна ділянка важкого ланцюга (HC)	<u>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNY</u> <u>WMNWVKQRPGRGLEWIGRIHPSDSETHYNQN</u> <u>FKSKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCA</u> <u>RPVLYGDYGFPCWGQGT</u> LVTVSA		мишачий
77	C2186варіабельна ділянка легкого ланцюга (LC)	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYD</u> <u>GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIP</u> <u>ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQ</u> <u>SNEDPYTFGGG</u> TKLEIK		мишачий
78	C2192варіабельна ділянка важкого ланцюга (HC)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSS</u> <u>WMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGDGDTNNGK</u> <u>FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC</u> <u>ARRWDGGNYFFDYWGQGT</u> TLTVSS		мишачий
79	C2192варіабельна ділянка легкого ланцюга (LC)	<u>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCMASQDVGT</u> <u>AVAWYQRRPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPDR</u> <u>FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYS</u> <u>SYPLTFGSG</u> TKLEIK		мишачий
80	C2177варіабельна ділянка важкого ланцюга (HC)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSS</u> <u>WMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGDGDTNNGK</u> <u>FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC</u> <u>ARSDYYGDYGFAYWGQGT</u> LVTVSA	H7	мишачий
81	C2177варіабельна ділянка легкого ланцюга (LC)	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIP</u> <u>ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQ</u> <u>SNEDPYTFGGG</u> TKLEIK	L18	мишачий
82	L35	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGQGT</u> TKLEIK	4-1/2	HFR вибраний для C2177 AM шлях 1

Под. ід. №	Клон	Послідовність (послідовності CDR підкреслені)	Характеристики чи походження	Коментарі
83	L255	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		VL в клонах M584, M600 AM; in M678, M680 PTM variants
84	L256	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSWMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYVASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 дозрівання афінності шлях 1
85	L257	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSWMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYTASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLLAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		VL в клонах M558, M596 AM
86	L258	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GSSFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYTASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 дозрівання афінності шлях 1
87	L260	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDWA</u> <u>GHSWMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYTASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 дозрівання афінності шлях 1
88	L261	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GSSFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYEASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 дозрівання афінності шлях 1
89	L267	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GESFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVAVYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		VL у варіантах M703, M706 PTM
90	L36	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>	O12/2	HFR вибраний для C2177 AM шлях 2
91	L216	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDY</u> <u>FSESYM</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>SNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM шлях 2
92	L217	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>HESFMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		VL в клонах M166 AM
93	L218	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYF</u> <u>GDSLMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM шлях 2
94	L219	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GDSFMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		VL в клонах M160, M169 AM
95	L219 PTM	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GESFMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		VL у варіантах M668, M669, M670, M671 PTM

Под. ід. №	Клон	Послідовність (послідовності CDR підкреслені)	Характеристики чи походження	Коментарі
96	L266	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYA</u> <u>GeSFMN</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYAASNLE</u> <u>SGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>LQPEDFATYYC</u> <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		VLy варіантах M668, M669, M670, M671 PTM
97	L220	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYA</u> <u>GDSYMN</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYAASNLE</u> <u>SGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>LQPEDFATYYC</u> <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		VL в клонах M158 AM
98	L221	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYE</u> <u>RTSFMN</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYAASNLE</u> <u>SGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>LQPEDFATYYC</u> <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM шлях 2
99	L222	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYV</u> <u>GTSFMN</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYAASNLE</u> <u>SGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>LQPEDFATYYC</u> <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM шлях 2
100	L223	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DY</u> <u>WSDSFMN</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYAASNLE</u> <u>SGV</u> <u>PSRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>LQPEDFATYYC</u> <u>QQ</u> <u>SNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM шлях 2
101	L224	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVAITCKASQSV</u> <u>DYY</u> <u>NSSFMN</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYAASNLE</u> <u>SGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>LQPEDFATYYC</u> <u>QQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM шлях 2
102	H24	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>AFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDG</u> <u>DTNYNG</u> <u>KFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS</u> <u>DTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>	IGHV5-51/4	обраний HFR C2177 AM шлях 2
103	H221	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>AFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSGDG</u> <u>DTNYNG</u> <u>KFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS</u> <u>DTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>		VH в клонах M169 AM
104	H257	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>AFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSGD</u> <u>aDTNYaq</u> <u>KFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS</u> <u>DTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>		VH у варіантах M670 PTM
105	H258	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>AFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSGD</u> <u>aDTNYNg</u> <u>KFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS</u> <u>DTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>		VH у варіантах M671 PTM
106	H25	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYA</u> <u>FS</u> <u>SSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYPGDG</u> <u>DTN</u> <u>YNGKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSLRSED</u> <u>TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>	IGHV1-46/4	HFR вибраний для C2177 AM, шлях 2
107	H196	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYA</u> <u>FS</u> <u>SSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYSGD</u> <u>GTN</u> <u>YNGKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSLRSED</u> <u>TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>		VH in M158, M160 AM clones
108	H255	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYA</u> <u>FS</u> <u>SSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYSGD</u> <u>ADTN</u> <u>YAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSLRSED</u> <u>TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>		VH у варіантах M668, M672 PTM
109	H256	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYA</u> <u>FS</u> <u>SSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYSGD</u> <u>ADTN</u> <u>YNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> <u>LSLRSED</u> <u>TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS</u>		VH у варіантах M669, M673 PTM

Под. ід. №	Клон	Послідовність (послідовності CDR підкреслені)	Характеристики чи походження	Коментарі
110	H197	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSS SSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYQGDDT NYNGKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVS S		C2177 клон AM
111	H28	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDGDTNYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS	IGHV5-51c/4	HFR вибраний для C2177 дозрівання афінності (AM) шлях 1
112	H236	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDGDTNYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARADYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		VH в клонах M584 AM шлях 1
113	H237	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIFVRDGDNTYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		C2177 клон AM шлях 1
114	H238	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYVGDGDTNYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		C2177 клон AM шлях 1
115	H239	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDGDNTYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		VH в клонах M596 AM шлях 1
116	H240	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYARDGDTNYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		VH в клонах M558, M600 AM, шлях 1
117	H241	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYGRDGDNTYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		C2177 клон AM шлях 1
118	H242	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYANDGDTNYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		C2177 клон AM шлях 1
119	H243	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYGGDGDNTYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		C2177 клон AM шлях 1
120	H244	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSGDGDNTYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		V2177 клон AM шлях 1
121	H245	EVQLVQSVAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSRDGDTNYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		C2177 клон AM шлях 1
122	H259	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDGTAYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARSDYYGDYGFAYWGQGLTVTVSS		VH в мутанті M678 PTM

Под. ід. №	Клон	Послідовність (послідовності CDR підкреслені)	Характеристики чи походження	Коментарі
123	H260	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDGTNYAP</u> <u>SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		VH в мутанті M680 PTM
124	H270	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDADTAYSP</u> <u>SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		VH в умтанті M703 PTM
125	H272	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDADTNYAP</u> <u>SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY</u> <u>CARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		VH в мутанті M706 PTM

Таблиця 39.

Под. ід.	Клон	Послідовність	Характеристики або походження	Коментарі
126	C2191 Варіабельна ділянка важкого ланцюга (HC)	<u>EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY</u> <u>TMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGNTYYPDS</u> <u>VKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDAMYY</u> <u>CSRHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>	H10	мишачий
127	C2191 Варіабельна ділянка легкого ланцюга (LC)	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTS</u> <u>GYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP</u> <u>ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQH</u> <u>SRELPTWTFGGGKLEIK</u>	L20	мишачий
128	H30	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSS</u> <u>YTMSWVRQAPGKGLEWVSYISSGGGNTYYP</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>	IGHV3-23/4	HFR, обраний для C2191 AM шлях 2
129	H79	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSY</u> <u>TMSWVRQAPGKGLEWVSAIDHGGGQTLYPD</u> <u>SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY</u> <u>YCARHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>		VH у варіанті M141 AM, шлях 2. Таблиця 29
130	H192	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSY</u> <u>TMSWVRQAPGKGLEWVSVIDHGGGSTHYPD</u> <u>SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY</u> <u>YCARHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>		VH у варіанті M408 AM, шлях 2. Таблиця 29
131	H31	<u>QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS</u> <u>YTMSWIRQAPGKGLEWVSYISSGGGNTYYPD</u> <u>SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY</u> <u>YCARHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>	IGHV3-11/4	HFR обраний для C2191 AM шлях 1
132	H222	<u>QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS</u> <u>YGMSWIRQAPGKGLEWVSYIDRGGGVTIYPD</u> <u>SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY</u> <u>YCARHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>		VH у варіанті M526 AM, шлях 1
133	H227	<u>QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS</u> <u>YGMSWIRQAPGKGLEWVSYIDEGGGQTIYPD</u> <u>SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY</u> <u>YCARHRGNPFDYWGGGTLTVSS</u>		VH у варіантах M427, M429, M488, M489 AM, шлях 1

Под. ід.	Клон	Послідовність	Характеристики або походження	Коментарі
134	H228	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMSWIRQAPGKGLEWVSYIDAGGGFTIYPDS VKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARHRGNPFDYWGGGTLVTVSS		VH у варіантах M492, M493 AM, шлях 1
135	H231	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMSWIRQAPGKGLEWVSHIDAGGGRTWYP DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARHRGNPFDYWGGGTLVTVSS		VH у варіанті M501 AM, шлях 1
136	H232	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YPMSWIRQAPGKGLEWVSHIATGGGNTYYPD SVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGGGTLVTVSS		клон C2191 AM, шлях 1
137	L40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSTS GYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSR ELPWTFGQGTKVEIK	IGKVO12/1	HFR, обраний для C2191 AM, шлях 2
138	L137	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSTS GYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVGSRLDYGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHS RELPTWTFGQGTKVEIK		VL у варіанті M408 AM, шлях 2. Таблиця 29
139	L173	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSHV RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHS RELPTWTFGQGTKVEIK		VL у варіанті M141 AM, шлях 2. Таблиця 29
140	L42	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSTS GYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHS RELPTWTFGQGTKVEIK	IGKVO8/1	HFR, обраний для C2191 AM шлях 1
141	L244	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSA WGYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVASRLESGV PSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQH SRELPTWTFGQGTKVEIK		VL у варіанті M427 AM, шлях 1
142	L245	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSHV RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASKLESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHS RELPTWTFGQGTKVEIK		VL у варіанті M429 AM, шлях 1
143	L249	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSEG RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVASRLESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHS RELPTWTFGQGTKVEIK		VL у варіантах M488, M492, M526 AM, шлях 1
144	L250	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSLD RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHS RELPTWTFGQGTKVEIK		VL у варіантах M489, M493, M501 AM, шлях 1
145	H39	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVSYISSGGGNTYYPDS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARHRGNPFDYWGGGTLVTVSS		HFR; VH в M131; клони M136-138 AM, шлях 2
146	H40	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVSAIDHGGGRTYYPD SVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGGGTLVTVSS		VH в M132; M139; клони M140 AM, шлях 2

Под. ід.	Клон	Послідовність	Характеристики або походження	Коментарі
147	H191	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVSAIDGGGGATYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGGGTLVTVSS		VH в M134; M143; M144; клони AM, шлях 2
148	L160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSVSYV RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHS RELPTWTFGGGTKVEIK		VL в M137; M160; M142; M143; клони M146, шлях 2

Таблиця 40

Білки CD27 и CD70

Под. ід. №:	ОПИС	Характеристики, аббревіатури
149	Людський CD27 прополіпептид	1-20 сигнал, 21-191 позаклітинний домен, 192-212 трансмембранний, 213-260 внутрішньоклітинний TPAPKSCPER HYWAQGKLCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDPCIPGVS FSPDHHTRPH CESCRRHCNSG LLVRNCTITA NAECACRNGW QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPHTLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRSLCSDFI RILVIFSGMF LVFTLAGALF LHQRRKYRSN KGESPVEPAE PCRYSCPREE EGSTIPIQED YRKPEPACSP
150	Людський CD70 прополіпептид	1-17 внутрішньоклітинний, 18-38 трансмембранний і 39-193 позаклітинний MPEEGSGCSV RRRPYGCVLR AALVPLVAGL VICLVVCIQR FAQAQQQLPL ESLGWDVAEL QLNHTGPQQD PRLYWQGGPA LGRSFLHGPE LDKGQLRIHR DGIYMVHIQV TLAICSSTTA SRHHPTTLAV GICSPASRSI SLLRLSFHQG CTIASQRLTP LARGDTLCTN LTGTLLPSRN TDETFFGVQW VRP

Таблиця 41

Послідовність константних ділянок антитіла

Опис	Послідовність	SEQ ID NO:
Константна ділянка людського важкого ланцюга IgG4 Ala/Ala Ser – Pro	astkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgly slssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcpapeaaggpsvflfp pkpkdtlmisrtpetvcvvdvsqedpevfqnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvs vltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqeemtknqvslt clvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflysriltvdksrwqegnvfscsv mhealhnhytqkslsislglk	159
Константна ділянка людського легкого ланцюга kappa	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvclnnfyfpreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqds kdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfngrec	160

Нуклеотидні послідовності антитіла

Опис	Послідовність	SEQ ID NO:
Послідовність, що кодує легкий ланцюг (кодує послідовність легкого ланцюга Пор. ід. №: 160)	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCG TGGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCAAGAGCGT GAGCGAGGGGCGATGGAGCTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAGACT GGAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGG CACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACA TCGCCACCTACTACTGCCAGCACAGCCGGGAGCTGCCCTGGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	163
Послідовність, що кодує важкий ланцюг (кодує послідовність важкого ланцюга Пор. ід. №: 159)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGCTGGTGAAGCCC GGCGGCAGCCTGCGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCAGCTACGGGATGAGCTGGATCCGGCAGGCCCGCCGCAA GGGCTGGAGTGGGTGAGCTACATCGATGAGGGCGGCGGCCAG ACCATCTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCG GGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGCACCGGGG CAACCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGA GCAGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCT ACAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAA ATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCGG GGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACT CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGG CGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCTGGGTA	164

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене анти-CD27 антитіло людини або його антигензв'язувальний фрагмент, яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга і варіабельну ділянку важкого ланцюга, де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить:
амінокислотну послідовність CDRL1 SEQ ID NO: 62;
амінокислотну послідовність CDRL2 SEQ ID NO: 68 і
амінокислотну послідовність CDRL3 SEQ ID NO: 75, і
де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить:
амінокислотну послідовність CDRH1, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 44 і 161;
амінокислотну послідовність CDRH2 SEQ ID NO: 47 і
амінокислотну послідовність CDRH3 SEQ ID NO: 58.
2. Виділене анти-CD27 антитіло людини або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, що містить амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга і амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, де амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга містить SEQ ID NO: 143, а амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга містить SEQ ID NO: 133.
3. Виділене антитіло за п. 1 або 2, яке додатково містить константну ділянку важкого ланцюга IgG4 та константну ділянку легкого ланцюга IgG4.
4. Виділене антитіло за п. 3, де константна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 159, а константна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 160.
5. Виділене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-4, де зазначене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язується з CD27 людини з K_D 1×10^{-7} М або менше, як визначається за допомогою поверхневого плазменного резонансу.
6. Готовий виріб, що включає фармацевтично прийнятну лікарську форму, що містить антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-4.
7. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-4.
8. Вектор або вектори виділеної нуклеїнової кислоти для експресії анти-CD27 антитіла людини або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-4, що містить виділену молекулу нуклеїнової кислоти за п. 7.
9. Прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн для вироблення анти-CD27 антитіла людини або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-4, що містить вектор або вектори виділеної нуклеїнової кислоти за п. 8.
10. Клітина-хазяїн за п. 9, де вказана клітина-хазяїн вибрана щонайменше з однієї з COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, клітин мієломи або лімфоми або їхніх похідних, іморталізованих або трансформованих клітин.
11. Спосіб отримання анти-CD27 антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-4, який включає введення молекули нуклеїнової кислоти за п. 7 у вектор, який трансформує клітину-хазяїна, трансгенну тварину або трансгенну рослину для експресії антитіла або його антигензв'язувального фрагмента та відновлення експресованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента.
12. Засіб для діагностики захворювання, пов'язаного з CD27, в клітині, тканині, органі або організмі тварини, що містить ефективну кількість щонайменше одного антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-4.
13. Засіб за п. 12, де зазначена ефективна кількість антитіла або його антигензв'язувального фрагмента становить приблизно 0,001-50 мг/кг на масу тіла зазначеної тварини.
14. Лікарський засіб для лікування захворювань, пов'язаних з CD-27, у людини або тварини, що містить ефективну кількість антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-4.
15. Лікарський засіб за п. 14, де зазначена ефективна кількість становить приблизно 0,001-50 мг/кг на масу тіла зазначеної тварини або людини.
16. Спосіб лікування пацієнта-людини, що має захворювання або розлад, пов'язаний з взаємодією CD27-CD70, що включає стадію введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості лікарського засобу за п. 14.
17. Спосіб за п. 16, де захворюванням або розладом, пов'язаним з взаємодією CD27-CD70, є запальне захворювання.
18. Спосіб за п. 17, де запальне захворювання являє собою системний червоний вовчак.

19. Спосіб за п. 16, де пацієнт проявляє антигенспецифічну гуморальну імунну відповідь, пов'язану з розладом, вибраним з групи, що складається із захворювань легеневої або плевральної системи, захворювання центральної або периферичної нервової системи, хвороби очей або зорової системи, захворювання шлунково-кишкового тракту і травної системи, захворювання серцево-судинної системи, інфекційного захворювання та паразитарної інфекції.
20. Спосіб за п. 16, де лікарський засіб інгібує проліферацію нативних Т-клітин шляхом інгібування активації CD27 на вказаних Т-клітинах людини в присутності білка CD70 людини або частини білка CD70 людини.

Фіг. 1

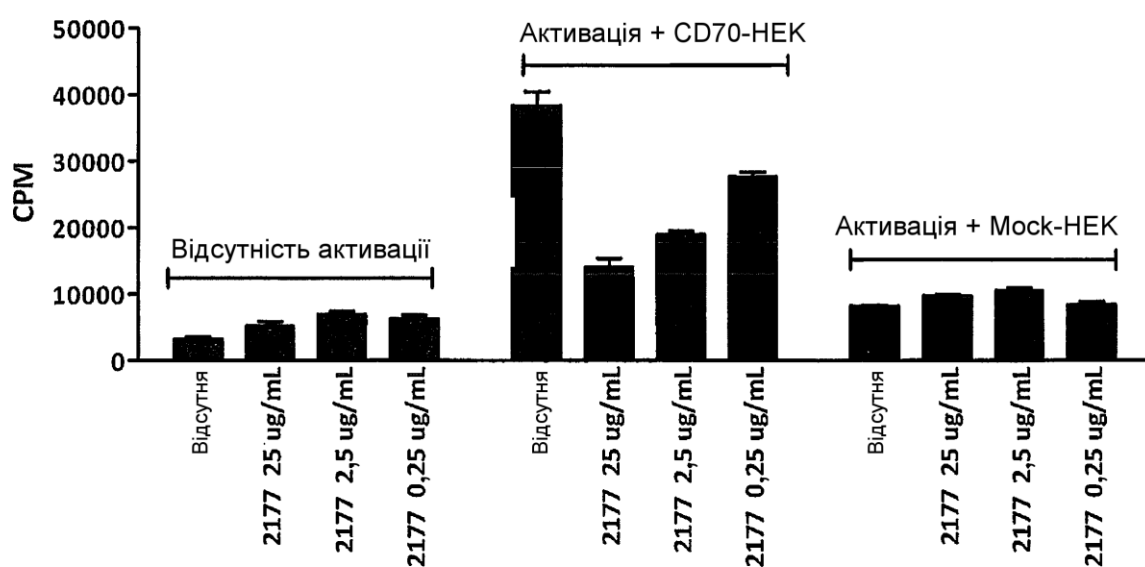


Fig. 2

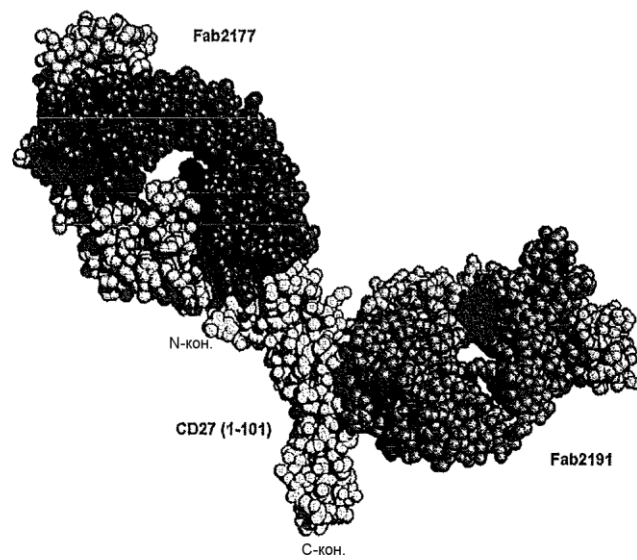
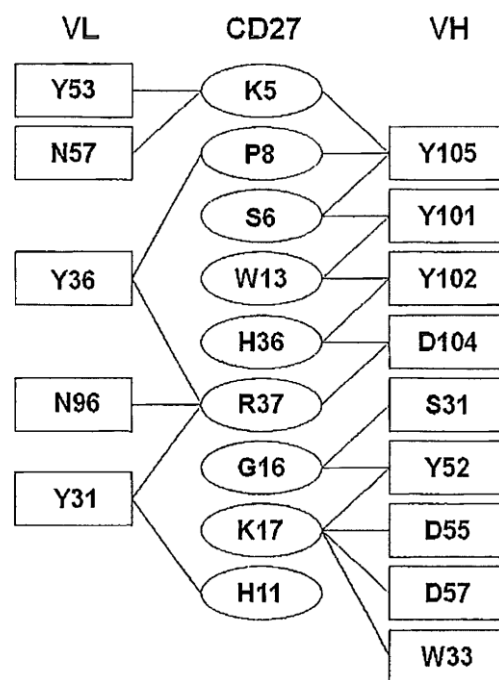
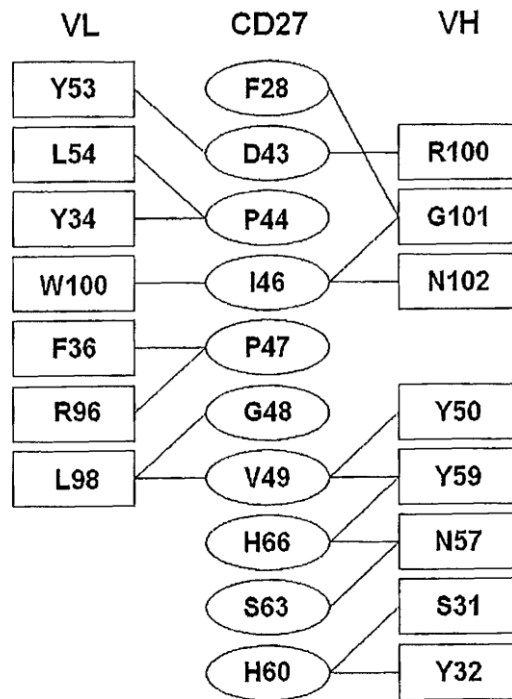


Fig. 3



Фиг. 4



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601