

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290771** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.31**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.05.08**

---

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИ-IL-1R3 АНТИТЕЛА**

---

(31) **16168617.5**

(32) **2016.05.06**

(33) **EP**

(62) **201892541; 2017.05.08**

(71) Заявитель:  
**САНОФИ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ  
SAS (FR)**

(72) Изобретатель:  
**Фишер Штефан, Брандт Михаэль,  
Казанджян Линда Вероник (DE)**

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

---

(57) Изобретение относится к гуманизированным антителам, которые специфически связываются с IL-1R3, или их фрагментам или производным или полипептидам, содержащим по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности. Указанные антитела подавляют индуцированную IL-1R3 активность NFκB. Они также подавляют активность NFκB, стимулированную IL-1альфа, IL-1бета, IL-33 и/или IL-36. Настоящее изобретение также относится к применению гуманизированного антитела для лечения IL-1R3-опосредованного заболевания, такого как рак. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела по изобретению. Фармацевтическая композиция может быть использована для лечения IL-1R3-опосредованного заболевания, такого как рак.

---

**A1**

**202290771**

**202290771**

**A1**

**ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИ-IL-1R3 АНТИТЕЛА**

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится гуманизированным анти-IL-1R3 антителам и их применению.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Акцессорный белок рецептора интерлейкина 1 (IL1RAP), также называемый IL1R3, представляет собой корецептор для рецептора интерлейкина-1 типа 1 (IL1R1) и является необходимым для сигнализации IL-1. При связывании IL-1, IL-1R1 соединяется с IL-1RAC1, образуя функциональный сигнальный рецепторный комплекс, который стимулирует активность NF $\kappa$ B.

IL-33, его рецептор ST2 и IL-1RAC1 также формируют комплекс (IL-33/ST2/IL-1RAC1) с аналогичной активностью по отношению к активизации NF $\kappa$ B, что и комплекс IL-1 $\beta$ /IL-1R1/IL-1RAC1. IL-36 (IL-36 $\alpha$  (IL-1F6), IL-36 $\beta$  (IL-1F8) и IL-36 $\gamma$  (IL-1F9)), их рецепторы IL-36R и IL-1RAC1 также формируют комплекс (IL-36/IL-36R/IL-1RAC1) с аналогичной активностью по отношению активизации NF $\kappa$ B, что и комплекс IL-1 $\beta$ /IL-1R1/IL-1RAC1.

Человеческий NF- $\kappa$ B является важным регулятором экспрессии нескольких генов, ответственных за воспаление, иммунный ответ и апоптоз. Следовательно, нарушение функции NF $\kappa$ B является одной из причин патологии при различных заболеваниях, включая аутоиммунные заболевания, дегенеративные заболевания, воспаление и злокачественные опухоли. Например, при лечении остеоартрита (ОА) путь NF- $\kappa$ B является важной мишенью. Таким образом, агенты, которые регулируют путь NF $\kappa$ B у человека через подавление сигнальной активности человеческого комплекса IL-1R1/IL-1RAC1 являются потенциальными терапевтическими средствами, полезными для лечения различных заболеваний человека. В частности, высокоаффинные нейтрализующие антитела могли бы оказаться прекрасными терапевтическими агентами.

В течение более чем 15 лет предпринимаются попытки по разработке функциональных моноклональных антител к человеческому IL1RAC1. Однако многие попытки оказались неудачными, и

существующие антитела все еще имеют различные недостатки.

Из WO199623067 известно анти-IL-1R $\alpha$  антитело, которое специфически связывается с мышинным акцессорным белком рецептора IL-1. В примерах 15 и 16 описаны попытки получения античеловеческих IL-1R $\alpha$  антител, нейтрализующих биологическую активность IL-1. Однако в WO199623067 такое антитело не представлено, и пример 16, описывающий анализ IL-6, индуцированный IL-1, является только гипотетическим. В J. Immunol. 1998; 160:3170-3179, Do-Young Yoon D-Y и Charles A. Dinarello CA описывают поликлональные антитела к доменам II и III мышинного IL-1R $\alpha$ , которые подавляют активность IL-1 $\beta$ , но не связываются с ним. Однако при более высоких концентрациях IL-1 $\beta$  (1000 пг/мл) эта поликлональная антисыворотка не блокировала пролиферацию клеток D10S. (D10S является субклоном мышинной линии Т-хелперов клона D10.G4.1, которые пролиферируют при субфемтомольных (аттомолярных) уровнях IL-1 бета или альфа в отсутствие митогенов, см. Orencole SF и Dinarello CA; Cytokine 1 (1989) 14-22). Jaras M. и др., PNAS 107 (2010) 16280-16285 описывают применение кроличьего поликлонального анти-IL1R $\alpha$  антитела KMT-1 для уничтожения стволовых клеток CML. Это антитело индуцирует вызванную кроличьим Fc-фрагментом ADCC независимым от IL1R $\alpha$  способом. Jaras et al. полагают, что «потенциальные будущие терапевтические антитела, нацеленные на IL1RAP, будут иметь низкую токсичность в нормальных гемопоэтических клетках». Поликлональные кроличьи антитела к мышинному IL-1R $\alpha$  также упоминаются у Do-Young Yoon и Charles A. Dinarello, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 4, July 2007, pp. 562-570.

WO2002064630 также относится к IL-1R $\alpha$  и его применению, но не описывает анти-IL-1R $\alpha$  антитела. В WO2004022718 и WO2009120903 говорится лишь о теоретической возможности получения антител к CSF1R, IL13RA1, IL1RAP, IFNAR1, IL5R, INSR, IL1RL1, LTK и TACSTD1 в соответствии с уровнем техники. Однако в этом документе также не описаны антитела к IL-1R $\alpha$ . WO2011021014 и WO 2012098407 (US20140017167) относятся к антисыворотке KMT-1 на основе поликлональных кроличьих

античеловеческих IL-1RAcP (см. Jaras et al., 2010) и ее применению. WO2014100772 описывает анти-IL-1RAcP антитело, связывающееся с IL-1RAcP. Однако в этом документе отсутствуют данные об активности в отношении подавления какого-либо функционального сигнального рецепторного комплекса (подобного IL-1 $\beta$ /IL-1R1/IL-1RAcP), стимулирующего активность NF $\kappa$ B. US6280955 относится к IL-1RAcP и его применению, но и в этом документе не раскрыты анти-IL-1RAcP антитела. В US7390880 упоминается N-терминальный фрагмент IL1RAcP, но нет описания анти-IL-1RAcP антител.

WO2004100987 относится к применению антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1) для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения неоинтимальной гиперплазии, а также к применению антагониста IL-1 для лечения неоинтимальной гиперплазии. В качестве такого антагониста предлагается анти-IL-1RAcP антитело, которое однако не описано. US2003026806 относится к антителам, связывающим IL-1. WO2002064630 относится к антагонисту IL-1 и к белку IL-1RAcP. Хотя в этом документе и упоминается применение IL-1RAcP для скрининга антагонистов IL-1RAcP, однако раскрытие такого способа или антагониста отсутствует.

Это свидетельствует о чрезвычайной сложности определения высокоаффинных и высокоспецифических моноклональных антител с сильной нейтрализующей активностью в отношении IL-1R3. Настоящее изобретение охватывает гуманизованное анти-IL-1R3-антитело, являющееся высокоаффинным и специфическим по отношению к IL-1R3, обладающее сильной нейтрализующей активностью по отношению к IL-1R3, и имеющее улучшенную стабильность.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к гуманизованному анти-IgG1<sub>LALA</sub> антителу, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, или полипептид, содержащий по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности. Указанное антитело подавляет активность NF $\kappa$ B, индуцированную IL-

1R3. Таким образом, оно подавляет активность NFκB, стимулированную IL-1альфа, IL-1бета, IL-33 и/или IL-36.

Настоящее изобретение также относится к антителу по изобретению для его применения для лечения заболевания, опосредованного IL-1R3.

Изобретение также относится к способу лечения IL-1R3-опосредованного заболевания у пациента, включающий введение пациенту фармацевтически эффективного количества указанного антитела.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество указанного антитела.

#### **Определения**

Термин «кролик» в соответствии с изобретением означает животное, относящееся к таксономической группе *Lagomorpha* (зайцеобразные), которая включает семейства (зайцы и кролики) и *Ochotonidae* (Пищуховые, пищухи), предпочтительно к роду *Oryctolagus* (кролики).

Термин «антитело» охватывает различные структурные формы антител, включая, без ограничения, целые антитела и фрагменты антител, при условии, что они проявляют свойства в соответствии с изобретением.

Термин «кроличье моноклональное антитело» в соответствии с изобретением означает моноклональное антитело, полученное иммунизацией кролика и выделенное из клетки этого кролика, продуцирующей антиген, а также означает антитело, которое дополнительно модифицировано, предпочтительно гуманизированное антитело, химерное антитело, его фрагмент, или антитело, дополнительно генетически модифицированное и полученное рекомбинантным способом, при условии сохранения им характерных свойств в соответствии с изобретением. Предпочтительно антитело получают из В-клетки или кроличьей гибридной клетки указанного кролика.

Термин «клетка, продуцирующая антитело» в соответствии с изобретением означает кроличью В-клетку, которая продуцирует антитела, предпочтительно В-клетку или кроличью гибридную

клетку.

«Нативные антитела» обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, при этом тяжелые цепи разных изотипов иммуноглобулина имеют разное количество дисульфидных связей. Таким образом, каждая тяжелая и легкая цепь имеют регулярно расположенные межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь содержит на одном конце переменный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь содержит на одном конце переменный домен (VL), а на другом конце константный домен. Константный домен легкой цепи совмещен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи совмещен с переменным доменом тяжелой цепи. Принято считать, что конкретные аминокислотные остатки формируют границу между переменными доменами легкой и тяжелой цепей.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности», относительно пептидной или полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и при необходимости введения пробелов (гэпов) для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, без учета любых консервативных замен в рамках идентичности последовательности. Выравнивание для определения идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами в пределах компетенции специалиста уровня техники, например, с помощью доступных компьютерных программ BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR).

Термин «VL (или VH) область» имеет такое же значение, что и VL (или VH) домен.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» в соответствии с изобретением относятся к рецептору человека, который связывается с Fc-фрагментом антитела. FcR связываются с IgG антителами и

включают рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся в основном цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) (см. обзор M. Daeron, *Annu Rev. Immunol* 15:203-234 (1997)). FcRIIIA (CD16a) опосредует ADCC. Обзор видов FcR можно найти у Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Эти и все другие FcR охвачены термином «FcR». Этот термин, следовательно, включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) и опосредует более медленный катаболизм, таким образом обеспечивая более длительный период полувыведения.

Используемый в настоящей заявке термин «эффекторная функция(-ии) антитела» или «эффекторная функция» относится к Fc-эффекторному(-ым) домену(-ам) IgG (например, к Fc-фрагменту иммуноглобулина). Такая функция может быть эффективной, например, при связывании Fc-эффекторного домена(-ов) с Fc-рецептором на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или путем связывания Fc-эффекторного домена(-ов) с компонентами системы комплемента. Типичными эффекторными функциями являются ADCC, ADCP и CDC.

«Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, который содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и

мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

«Антитело, которое связывается с таким же эпитопом», что и эталонное антитело относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более и, наоборот, эталонное антитело блокирует связывание указанного антитела со своим антигеном в конкурентном анализе на 50% и более. В настоящей заявке приведен пример конкурентного анализа.

Термин «антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие FcR (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

Термин «антитело-зависимый клеточный фагоцитоз» и «ADCP» относится к процессу, посредством которого клетки, покрытые антителами, интернализуются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с Fc-фрагментом иммуноглобулина.

«C1q» представляет собой полипептид, который включает сайт связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина. C1q вместе с двумя сериновыми протеазами, C1r и C1s, образуют C1 комплекс, первый компонент комплементзависимого цитотоксического (CDC) пути. Человеческий C1q является коммерчески доступным, например, у компаний Quidel, San Diego, Calif.

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которую имеет тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие разным классам



иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.

«Эффективное количество» агента, например фармацевтической композиции, относится к эффективному количеству в дозах и периодах времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

Термин «Fc-фрагмент» используется для обозначения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Этот термин включает нативные последовательности Fc-фрагментов и вариантных Fc-фрагментов. Если в настоящей заявке не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-фрагменте или константной области соответствует ЕС системе нумерации, также называемой EU-индексом, описанной у Kabat др. в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

«Вариантный Fc-фрагмент» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от «нативного» Fc-фрагмента или Fc-фрагмента «дикого типа» в силу по меньшей мере одной «аминокислотной модификации», как определено в настоящей заявке. Термин «Fc-вариант», используемый в настоящей заявке, относится к полипептиду, содержащему модификацию в Fc-домене. Fc-варианты по настоящему изобретению определены в соответствии с аминокислотными модификациями в их составе. Так, например, P329G представляет собой Fc-вариант с заменой пролина глицином в положении 329 относительно родительского Fc-полипептида, при этом нумерация соответствует EU-индексу. Идентичность аминокислоты дикого типа может быть не установлена, и в этом случае вышеупомянутый вариант обозначается как P329G. Для всех положений, обсуждаемых в настоящем изобретении, нумерация соответствует EU-индексу. EU-индекс или EU-индекс по Кабату, или EU-схема нумерации относится к EU-нумерации антител (Edelman, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 63 (1969) 78-85, включенный в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки). Модификация может представлять собой добавление, делецию или замену. Замены могут включать природные аминокислоты и не

встречающиеся в природе аминокислоты. Варианты могут включать не встречающиеся в природе аминокислоты. Примеры можно найти в патенте США 6586207; WO 98/48032; WO 03/073238; US 2004/0214988 A1; WO 05/35727 A2; WO 05/74524 A2; Chin, J. W., et al., Journal of the American Chemical Society 124 (2002) 9026-9027; Chin, J.W. и Schultz, P.G., Chem. BioChem 11 (2002) 1135-1137; Chin, J.W., et al., PIGAS United States of America 99 (2002) 11020-11024; и Wang L., Schultz, P.G., Chem. (2002) 1-10, все из которых включены в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

Термин «полипептид, содержащий Fc-фрагмент» относится к полипептиду, такому как антитело или иммуноадгезин (определения см. ниже), который содержит Fc-фрагмент.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используется для описания рецептора, который связывается с Fc-фрагментом антитела. FcR, который связывается с IgG антителом (гамма-рецептором), включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся в основном цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) (см. обзор Daeron, M., Annu Rev. Immunol., 15 (1997) 203-234). Обзор видов FcR можно найти у Ravetch, and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9 (1991) 457-492; Capel, et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34; and de Haas, et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-41. Термином «FcR» охвачены и другие FcR, включая рецепторы, определенные ниже. Этот термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al, J. Immunol. 117:1976 (587) and Kim et al, J. Immunol. 24:1994 (249)).

«Fc-лиганд IgG», используемый в настоящей заявке,

предпочтительно означает полипептид, полученный из любого организма, который связывается с Fc-фрагментом IgG антитела с образованием комплекса Fc/Fc-лиганд. Fc-лиганды включают, без ограничения, FcγR, FcγR, FcγR, FcRn, Clq, C3, маннан-связывающий лектин, маннозный рецептор, стафилококковый белок А, стрептококковый белок G и вирусный FcγR. Fc-лиганды также включают гомологи Fc-рецепторов (FcRH), которые представляют собой семейство Fc-рецепторов, которые являются гомологичными FcγR (Davis, et al., Immunological Reviews 190 (2002) 123-136, включенный в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки). Fc-лиганды могут включать неоткрытые еще молекулы, которые связываются с Fc. Конкретными Fc-лигандами IgG являются FcRn и Fc гамма-рецепторы. Под «Fc-лигандом», используемым в настоящей заявке, подразумевается молекула, предпочтительно полипептид, полученная из любого организма и которая связывается с Fc-фрагментом антитела с образованием комплекса Fc/Fc-лиганд.

Термин «Fc гамма-рецептор», «FcγR» или «Fc-гаммаR», используемый в настоящей заявке, означает член семейства белков, которые связываются Fc-фрагментом IgG антитела и кодируются геном FcγR. У людей это семейство включает, без ограничения, FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIA, FcγRIB и FcγRIC; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIA (в том числе аллотипы H131 и R131), FcγRIIB (включая FcγRIIB-1 и FcγRIIB-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIA (в том числе аллотипы VI58 и F158) и FcγRIIIb (в том числе аллотипы FcγRIIB-NA1 и FcγRIIB-NA2) (Jefferis et al., Immunol Lett 82 (2002) 57-65, включенный в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки), а также любые неоткрытые изоформы или аллотипы человеческого FcγR. FcγR может быть из любого организма, включая, без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Мышиные FcγR включают, без ограничения, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2), а также любые неоткрытые изоформы или аллотипы мышиного FcγR.

«FcRn» или «неонатальный Fc-рецептор», используемый в настоящей заявке, означает белок, который связывается с Fc-фрагментом IgG антитела и кодируется, по меньшей мере, частично

геном FcRn. FcRn может быть из любого организма, включая, без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Как известно в данной области техники, функциональный белок FcRn содержит два полипептида, часто называемых тяжелой цепью и легкой цепью. Легкая цепь представляет собой бета-2-микроглобулин, а тяжелая цепь кодируется геном FcRn. Если не указано иное, FcRn или белок FcRn относится к комплексу тяжелой цепи FcRn с бета-2-микроглобулином.

«Иммуноконъюгат» означает антитело, конъюгированное с одним или более цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибитор роста, токсин, другое антитело или радиоактивный изотоп.

«Фрагменты антитела» включают часть полноразмерного антитела, предпочтительно его переменные области, или, по меньшей мере, его антигенсвязывающий участок. Примеры фрагментов антител включают диатела, Fab-фрагменты и одноцепочечные молекулы антител. Антитела scFv описаны, например, у Huston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88.

Термин «моноклональное антитело» или «композиция моноклональных антител», используемая в настоящей заявке, относится к получению молекул антитела одного аминокислотного состава.

Термин «гуманизированное антитело» или «гуманизированная версия антитела» относится к антителам, у которых человеческая переменная область модифицирована таким образом, что она содержит CDR антитела по изобретению. В предпочтительном варианте осуществления CDR VH и CDR VL привиты на каркасную область человеческого антитела для получения «гуманизированного антитела». См., например, Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; и Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Переменные каркасные области тяжелой и легкой цепей могут быть получены из одних и тех же или разных последовательностей человеческих антител. Последовательности человеческих антител могут быть последовательностями встречающихся в природе человеческих антител. Переменные каркасные области тяжелой и легкой цепей человека перечислены,

например, у Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology (2000) - Приложение IP A.1P.1-A.1P.37 и доступны через IMGT, международную информационную систему ImMunoGeneTics® (<http://imgt.cines.fr>) или по адресу: <http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk>.

Термины «специфическое связывание, против мишени (к мишени) или антитело против (к) мишени», используемые в настоящей заявке, относятся к связыванию антитела с соответствующим антигеном (мишенью), измеренному методом ELISA, где указанный ELISA предпочтительно содержит нанесение соответствующего антигена на твердую подложку, добавление указанного антитела в условиях, позволяющих образование иммунного комплекса с соответствующим антигеном или белком, обнаружение указанного иммунного комплекса путем измерения значения оптической плотности (OD) с помощью вторичного антитела, связывающегося с антителом по изобретению, и использование опосредованного пероксидазой окрашивания.

Термин «антиген» в соответствии с изобретением относится к антигену, используемому для иммунизации, или к белку, содержащему указанный антиген в виде части последовательности. Например, для иммунизации может быть использован фрагмент внеклеточного домена белка (например, первые 20 аминокислот), а для обнаружения/анализа и т.п. может быть использован внеклеточный домен этого белка или полноразмерный белок.

Термин «специфически связывающийся» или «специфически узнаваемый», используемый в настоящей заявке, означает, что антитело проявляет заметное сродство к антигену и, предпочтительно, не имеет значимой перекрестной специфичности.

«Заметное» сродство к связыванию включает связывание со сродством по меньшей мере  $10 \times 10^7 M^{-1}$ , в частности, по меньшей мере,  $10 \times 10^8 M^{-1}$ , более конкретно, по меньшей мере,  $10 \times 10^9 M^{-1}$  или более конкретно по меньшей мере  $10 \times 10^{10} M^{-1}$ .

Антитело, которое «не проявляет значимой перекрестной специфичности», представляет собой антитело, нежелательное связывание которого с другим белком является не детектируемым.

Антитело, специфическое по отношению к эпитопу, в соответствии с изобретением, не будет, например, давать значимую перекрестную реакцию с другими эпитопами на IL-1R3. Специфическое связывание может быть определено согласно любому признанному в данной области средству для определения такого связывания, например, с помощью конкурентных анализов связывания (например, ELISA).

Все термины, относящиеся к белку, используемые в настоящей заявке, относятся к человеческим белкам. Если речь идет о белке от другого вида, об этом указано в явном виде.

Термин «IL-1альфа», используемый в настоящей заявке, относится к человеческому IL-1 (UniProtKB P01583). Термин «IL-1бета», используемый в настоящей заявке, относится к человеческому IL-1бета (UniProtKB P01584). IL-1 стимулирует пролиферацию тимоцитов путем индукции высвобождения IL-2, созревание и пролиферацию В-клеток и активность фактора роста фибробластов. Белки IL-1 участвуют в воспалительном ответе, обозначаемому как эндогенные пирогены (UniProtKB).

Термин «IL-33», используемый в настоящей заявке, относится к человеческому IL-33 (UniProtKB O95760), цитокину, который связывается с рецептором IL1RL1/ST2 и передает сигналы через этот рецептор, активирующий, в свою очередь, NF-каппа-В и MAPK сигнальные пути в клетках-мишенях (UniProtKB).

Термин «IL-36», используемый в настоящей заявке, относится к человеческому IL-36альфа (UniProtKB Q9UHA7), IL-36бета (UniProtKB Q9NZH7) и или IL-36гамма (UniProtKB Q9NZH8). IL-36 представляют собой цитокины, которые связываются с рецептором IL1RL2/IL-36R и передают сигналы через этот рецептор, активирующий, в свою очередь, NF-каппа-В и MAPK сигнальные пути в клетках-мишенях, связанных с провоспалительным ответом. По-видимому, IL-36, участвует в каждой воспалительной реакции путем воздействия на кератиноциты, дендритные клетки и опосредованно на Т-клетки для стимуляции инфильтрация ткани, созревания клеток и пролиферации клеток (UniProtKB).

Используемый в настоящей заявке термин «NFκB» относится к человеческому нуклеарному фактору NF-каппа-В, который состоит из субъединицы p105 (P19838) и субъединицы p100 (Q00653).

«Ингибирование NFκB» измеряют в соответствии с изобретением в виде подавления экспрессии гена NFκB-зависимой люциферазы в человеческих клетках. Такими способами являются, например, способы, описанные у Windheim M. et al., Mol. Cell. Biol. 28 (2008) 1783-1791; Huang J. et al. PNAS USA 94 (1997) 12829-12832; Xiaoxia L. et al., Mol. Cell, Biol. 19 (1999) 4643-4652. Если речь идет о мышном NFκB, об этом указано в явном виде.

«Вариабельная область (или домен) антитела в соответствии с изобретением» (вариабельная область легкой цепи (VL), вариабельная область тяжелой цепи (VH)), используемая в настоящей заявке, означает каждую из пары областей легкой и тяжелой цепей, которые непосредственно участвуют в связывании антитела с антигеном. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждая область содержит четыре структурные (FR) области, последовательности которых являются в значительной степени консервативными, связанными с тремя определяющими комплементарность областями, CDR. Антитело в соответствии с изобретением содержит VH область и VL область или их части, которые обе вместе являются достаточными для специфического связывания с соответствующим антигеном.

Термин «антигенсвязывающая часть антитела», когда используется в настоящей заявке, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Антигенсвязывающая часть антитела содержит предпочтительно аминокислотные остатки из «определяющих комплементарность областей» или «CDR». Последовательности CDR определены в соответствии с Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Используя эту систему нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может включать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или CDR вариабельной области.

Фразы «парентеральное введение» и «введенный

парентерально», используемые в настоящей заявке, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно осуществляемые путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Термин «рак», используемый в настоящей заявке, может представлять собой, например, рак легких, немелкоклеточный рак легких, бронхиолоальвеолярный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, мезотелиому, гепатоцеллюлярный рак, рак желчного протоков, злокачественные опухоли центральной нервной системы (ЦНС), опухоли позвоночника, глиому ствола головного мозга, мультиформную глиобластому, астроцитому, шванному, эпендимому, медуллобластому, менингиому, плоскоклеточный рак, аденому гипофиза, лимфому, лимфоцитарную лейкемию, в том числе рефрактерные варианты любого из указанных выше видов рака, или комбинацию одного или более из вышеуказанных видов рака.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Гуманизация антител, полученных из иммунизированных млекопитающих, необходима как качественная особенность в развитии, когда указанные антитела предназначены для применения в качестве терапевтических средств для человека. Целью



гуманизации является сохранение, насколько это возможно, первоначальных характеристик (специфичности связывания, активности) антитела, при этом уменьшая иммунологические побочные эффекты, которые могут возникать при введении людям негуманизированных антител, полученных из другого организма. Настоящее изобретение основано на известной стратегии гуманизации путем прививки CDR. В настоящей заявке, параллельно было создано большое количество активных гуманизированных антител, и для дальнейшей оценки были отобраны лучшие кандидаты.

Как указано во введении настоящей заявки, чрезвычайно сложно определить моноклональные антитела с высоким сродством, высокой специфичностью и сильной нейтрализующей активностью против IL-1R3. Настоящее изобретение охватывает гуманизированное анти-IL-1R3 антитело с высоким сродством и специфичностью к IL-1R3, с мощной активностью, нейтрализующей IL-1R3, и улучшенной стабильностью.

В частности, настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагменту или производному, содержащему по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, содержащему:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области, содержащие CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3,

где область CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:69-85,

где область CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:86-102,

и где область CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:103-119; и

б) переменную область легкой цепи (VL), содержащую определяющие комплементарность области, содержащие CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3,

где область CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:120-136,

где область CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:137-153, и

где область CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:154-170 и 175.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит замену в положении 2 CDR-L3. Указанная замена может быть заменой цистеина серином.

Более того, настоящее изобретение включает гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая является идентичной по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% VH области, выбранной из группы, состоящей из VH областей, приведенных в SEQ ID NO:1-34 и SEQ ID NO:173.

В одном из вариантов осуществления, гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, содержит последовательность переменной области тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, выбранной из группы VH последовательностей в соответствии с изобретением.

В некоторых вариантах осуществления VH последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, при этом антитело сохраняет способность специфически связываться, согласно изобретению, с соответствующим антигеном.

Настоящее изобретение также относится к гуманизованному

антителу, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагменту или производному, содержащему по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, причем антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), которая является идентичной по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% VL области, выбранной из группы, состоящей из VL областей, приведенных в SEQ ID NO:35-68 и 174.

В другом варианте осуществления гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, содержит переменную область легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности VL последовательностей по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления VL последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, при этом антитело сохраняет способность специфически связываться с соответствующим антигеном.

В некоторых вариантах осуществления в указанных VL последовательностях заменяют, вставляют и/или удаляют в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях, расположенных за пределами CDR (т.е. в FR). Настоящее изобретение также относится к аффинности созревших антител, которые могут быть получены способами, известными в данной области. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывает созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркаса описаны: Barbas

et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992) и WO2010108127.

В некоторых вариантах осуществления в каждой из указанных VH или VL последовательностях заменяют, вставляют и/или удаляют в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит замену в положении 90 последовательности VH или VL. Предпочтительно, чтобы аминокислота в положении 90 была заменена серином. Эта замена находится предпочтительно в положении 90 вариабельной области легкой цепи (VL). В предпочтительном варианте осуществления цистеин в положении 90 в SEQ ID. NO: 62 заменяют серином. Однако антитела по настоящему изобретению не ограничены заменой аминокислоты в положении 90, и могут содержать любую замену, делецию или вставку, которая дает функциональное антитело, обладающее свойствами антитела по изобретению. Следовательно, последовательности VL и VH по настоящему изобретению могут также содержать дополнительные мутации в разных положениях.

В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции находятся в областях, расположенных за пределами CDR (т.е. в FR).

В других вариантах осуществления замены, вставки или делеции находятся в областях CDR. В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело по изобретению содержит замену в положении 2 CDR-L3. Предпочтительно, чтобы это была замена цистеина серином. В одном из вариантов осуществления указанная замена находится в SEQ ID NO:164.

Настоящее изобретение также включает гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, причем антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий

аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:1-34 и 173.

Предпочтительно последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) представляет собой SEQ ID NO:1, альтернативно SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, или SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, или альтернативно SEQ ID NO:34 или 173.

Более того, настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагменту или производному, содержащему по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, причем антитело содержит вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO:35-68 и 174.

Еще более предпочтительной является последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), представляющая собой SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, или альтернативно SEQ ID NO:68 или 174.

Гуманизованное антитело по изобретению, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, также содержит область VH и область

VL, содержащие соответствующие области CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из: MAB-15-0139, MAB-15-0106, MAB-15-0108, MAB-15-0110, MAB-15-0117, MAB-15-0121, MAB-15-0140, MAB-15-0115, MAB-15-0125, MAB-15-0119, MAB-15-0109, MAB-15-0097, MAB-15-0135, MAB-15-0133, MAB-15-0107, MAB-15-0128, MAB-15-0116, MAB-16-0004, MAB-16-0009, MAB-16-0028, MAB-16-0031, MAB-16-0043, MAB-16-0049, MAB-16-0045, MAB-16-0040, MAB-16-0036, MAB-16-0046, MAB-16-0030, MAB-16-0021, MAB-16-0019, MAB-16-0015, MAB-16-0027, MAB-16-0048, MAB-16-0041, MAB-16-0149, MAB-16-0150.

В одном из вариантов осуществления гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, содержит SEQ ID NO:1 и 35 или SEQ ID NO:2 и 36. Антитело по изобретению может содержать SEQ ID NO:3 и 37 или SEQ ID NO:4 и 38, или SEQ ID NO:5 и 39, или SEQ ID NOS: 6 и 40, или SEQ ID NO:7 и 41, или SEQ ID NO:8 и 42, или SEQ ID NO:9 и 43, или SEQ ID NO:10 и 44, или SEQ ID NO:11 и 45, или SEQ ID NO:12 и 46. Альтернативно, антитело по изобретению содержит SEQ ID NO:13 и 47 или SEQ ID NO:14 и 48, или SEQ ID NO:15 и 49, или SEQ ID NO:16 и 50, или SEQ ID NO:17 и 51, или SEQ ID NO:18 и 52, или SEQ ID NO:19 и 53, или SEQ ID NO:20 и 54, или SEQ ID NO:21 и 55, или SEQ ID NO:22 и 56, или SEQ ID NO:23 и 57, или SEQ ID NO:24 и 58, или SEQ ID NO:25 и 59, или SEQ ID NO:26 и 60, или SEQ ID NO:27 и 61.

Альтернативно, антитело по изобретению содержит SEQ ID NO:28 и 62 или SEQ ID NO:29 и 63, или SEQ ID NO:30 и 64, или SEQ ID NO:31 и 65, или SEQ ID NO:32 и 66, или SEQ ID NO:33 и 67, или SEQ ID NO:34 и 68.

Наиболее предпочтительно, гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, содержит последовательности константных областей CR-H (SEQ ID NO 172) и CR-L (SEQ ID NO:171) и область VH, выбранную из группы SEQ ID NO:1-34 и 173, и

область VL, выбранную из группы SEQ ID NO:35-68 и 174.

Гуманизированное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, также содержит последовательности константных областей CR-H (SEQ ID NO. 172) и CR-L (SEQ ID NO. 171) и области VH и VL, содержащие соответствующие области CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из: MAB-15-0139, MAB-15-0106, MAB-15-0108, MAB-15-0110, MAB-15-0117, MAB-15-0121, MAB-15-0140, MAB-15-0115, MAB-15-0125, MAB-15-0119, MAB-15-0109, MAB-15-0097, MAB-15-0135, MAB-15-0133, MAB-15-0107, MAB-15-0128, MAB-15-0116, MAB-16-0004, MAB-16-0009, MAB-16-0028, MAB-16-0031, MAB-16-0043, MAB-16-0049, MAB-16-0045, MAB-16-0040, MAB-16-0036, MAB-16-0046, MAB-16-0030, MAB-16-0021, MAB-16-0019, MAB-16-0015, MAB-16-0027, MAB-16-0048, MAB-16-0041, MAB-16-0149 и MAB-16-150.

В соответствии с предпочтительным терапевтическим применением антител по изобретению, эффекторные функции (такие как ADCC) антител по изобретению снижены или отсутствуют. В отличие от других антител предшествующего уровня техники, таких как CAN04 (как WO 2015/132602 A1), антитела по изобретению не имеют увеличенных эффекторных функций и не индуцируют ADCC.

Предпочтительно, гуманизированные антитела по изобретению показывают сниженную сигнализацию Fcγ-рецептора или их отсутствие.

Следовательно, изобретение также относится к гуманизированному антителу, которое содержит по меньшей мере аминокислотные замены в L234A и L235A Fc-фрагмента человеческого IgG1 или S228P и L235E Fc-фрагмента человеческого IgG4.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой гуманизированное IgG1<sub>LALA</sub> антитело.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для

обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, подавляет NFκB активность, индуцированную IL-1R3.

В другом варианте осуществления гуманизованное антитело по изобретению, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, связывается с тем же самым эпитопом, что и антитело, выбранное из группы антител МАВ-15-0139, МАВ-15-0106, МАВ-15-0108, МАВ-15-0110, МАВ-15-0117, МАВ-15-0121, МАВ-15-0140, МАВ-15-0115, МАВ-15-0125, МАВ-15-0119, МАВ-15-0109, МАВ-15-0097, МАВ-15-0135, МАВ-15-0133, МАВ-15-0107, МАВ-15-0128, МАВ-15-0116, МАВ-16-0004, МАВ-16-0009, МАВ-16-0028, МАВ-16-0031, МАВ-16-0043, МАВ-16-0049, МАВ-16-0045, МАВ-16-0040, МАВ-16-0036, МАВ-16-0046, МАВ-16-0030, МАВ-16-0021, МАВ-16-0019, МАВ-16-0015, МАВ-16-0027, МАВ-16-0048, МАВ-16-0041, МАВ-16-0149 и МАВ-16-150.

Антитела по изобретению имеют преимущество, заключающееся в их высокой эффективности при связывании со своей мишенью. Они обладают высокой связывающей способностью по отношению к своему антигену, IL1R3, но не к другим рецепторам. Связывающие свойства антител изучали с помощью биохимического фермент-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA) и анализа связывания с клетками (проточной цитометрии), которые показаны на Фиг. 2, 6 и 7.

Предпочтительные антитела по изобретению показали половинную максимальную эффективную концентрацию (EC50), составляющую менее 30 нг/мл, предпочтительно менее 20 нг/мл. В других вариантах осуществления они показали EC50, составляющую менее 15 нг/мл, 10 нг/мл или менее 5 нг/мл. Предпочтительные антитела по изобретению показали в биохимическом ELISA эксперименте EC50, равное 16,3 нг/мл (см. Фиг. 7).

Антитела по изобретению также показали очень высокий уровень связывания со своим антигеном в экспериментах, в которых человеческий IL1R3 экспрессировался в разных клеточных линиях, при этом антитела не связывались с клеточными линиями, не экспрессирующими IL1R3 (например, NIH-3T3, см. Фиг. 5).



В клеточных линиях SK-MEL-30 с высоким уровнем экспрессии IL1R3 (см. Фиг. 6, Пример 8) EC50 антител составляет предпочтительно менее 400 нг/мл, более предпочтительно менее 350 нг/мл или менее 310 нг/мл.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитела по изобретению подавляют активность NFκB, стимулированную IL-1α и/или IL-1β. На Фиг. 3, 4 и 8 показана сильная ингибирующая активность антител по изобретению.

В одном из вариантов осуществления гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, подавляет NFκB активность, стимулированную IL-1α.

В другом варианте осуществления гуманизованное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмент или производное, содержащее по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, подавляет NFκB активность, стимулированную IL-1β.

Предпочтительным является то, что антитело по изобретению подавляет NFκB активность, стимулированную IL-1β, в клетках HEK293T/17-FR со значением EC50 менее чем 100 нг/мл, предпочтительно менее чем 95 нг/мл, 85 нг/мл, 75 нг/мл, 65 нг/мл, 55 нг/мл, 45 нг/мл, 35 нг/мл, 25 нг/мл, 20 нг/мл, и наиболее предпочтительно менее чем 15 нг/мл (например, см. Фиг. 3).

Также предпочтительным является то, что антитело по изобретению подавляет NFκB активность, стимулированную IL-1α, в A549-NFκB-RE-Luc клетках со значением EC50 менее чем 1000 нг/мл, предпочтительно менее чем 500 нг/мл, 300 нг/мл, 200 нг/мл, и наиболее предпочтительно менее чем 100 нг/мл (например, см. Фиг. 8)

Также предпочтительным является то, что антитело по изобретению подавляет NFκB активность, стимулированную IL-1α, в A549-NFκB-RE-Luc клетках со значением EC50 менее чем

700 нг/мл, предпочтительно менее чем 600 нг/мл, 300 нг/мл, 200 нг/мл, 100 нг/мл, и наиболее предпочтительно менее чем 50 нг/мл (например, см. Фиг.8).

Изобретение также относится к гуманизированному антителу, которое подавляет активность NFκB, стимулированную комплексом, выбранным из группы, состоящей из: IL-1β/IL-1R1/IL-1RAcP, IL-1α/IL-1R1/IL-1RAcP, IL-33/ST2/IL-1RAcP и/или IL-36/IL-36R/IL-1RAcP.

Более того, гуманизированное антитело по изобретению подавляет экспрессию NFκB в лизатах клеток A549-NFκB-RE-Luc (система для люциферазного анализа Steady-Glo™; Promega, Cat No. E2510), стимулированных 0,1 нг/мл человеческого IL-1 альфа, IL-1 бета, IL-33 и/или IL-36 человека (молекулярный вес см. UniProtKB/Swiss-Prot), при концентрации 10 мкг/мл (изотип кроличьих IgG с молекулярным весом 150 кДа) на 50% или более, предпочтительно на 70% или более, предпочтительно на 80% или более или предпочтительно на 90% и более, или более предпочтительно на 95% или более относительно результатов того же самого анализа без указанного антитела по изобретению.

В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело по изобретению подавляет активность люциферазы, стимулированную IL-1 альфа, IL-1 бета, IL-33 и/или IL-36, соответственно в клетках HEK 293T/17 (клетки HEK 293T/17-FR трансфицированные люциферазой под контролем репортерного гена NF-κB), клетках HEK-Blue-IL33™ (Invivogen) или клетках HEK-293/17-IF.

Предпочтительно, указанная активность люциферазы, стимулированная IL-1 альфа, подавляется на 50% или более, предпочтительно на 70% или более, предпочтительно на 80% или более, предпочтительно на 90% и более и более предпочтительно на 95% или более. Предпочтительно, указанная активность люциферазы, стимулированная IL-1 альфа, подавляется на 95%.

Предпочтительно указанная активность люциферазы, стимулированная IL-1 бета, подавляется на 50% или более, предпочтительно на 70% или более, предпочтительно на 80% или

более, предпочтительно на 90% и более и более предпочтительно на 95% или более. Предпочтительно активность люциферазы, стимулированная IL-1бета, подавляется на 95%.

Предпочтительно указанная активность люциферазы, стимулированная IL-33, подавляется на 50% или более, предпочтительно на 70% или более, предпочтительно на 80% или более, предпочтительно на 90% и более и более предпочтительно на 95% или более. Предпочтительно указанная активность люциферазы, I стимулированная L-33, подавляется на 95%.

Предпочтительно указанная активность люциферазы, стимулированная IL-36, подавляется на 50% или более, предпочтительно на 70% или более, предпочтительно на 80% или более, предпочтительно на 90% и более и более предпочтительно на 95% или более. Предпочтительно указанная активность люциферазы, стимулированная L-36, подавляется на 95%.

Кроме того, антитела по изобретению подавляют высвобождение IL-6, опосредованное человеческими IL-1a и IL-1b, и превосходят по эффективности поликлональные антитела. Эта сильная ингибирующая активность показана и проиллюстрирована на фиг.9. В этих экспериментах значения EC50 свидетельствуют о том, что гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела превосходят активность козлиных поликлональных антител AF676 к человеческим IL-1R3 (фиг. R&D Systems). В предпочтительных вариантах осуществления антитела подавляют высвобождение IL-6, опосредованное IL-1a, с EC50 менее чем 2500 мкг/мл, предпочтительно менее чем 1500 нг/мл, менее чем 1000 нг/мл, менее 600 нг/мл, менее 400 нг/мл или менее 300 нг/мл. Предпочтительным также является то, что антитела по изобретению подавляют высвобождение IL-6, опосредованное IL-1b, с EC50 менее чем 500 нг/мл, предпочтительно менее чем 400 нг/мл, менее чем 300 нг/мл, менее чем 200 нг/мл или менее чем 150 нг/мл.

В другом варианте осуществления изобретения антитела подавляют сигнализацию NfκB, опосредованную IL-33. На Фиг. 10 показана ингибирующая активность выбранных антител по изобретению в клетках HEK-Blue-IL33™ и показано их превосходство над поликлональными антителами. В предпочтительных вариантах

осуществления антитела подавляют сигнализацию NfκB, опосредованную IL-33, с EC50 менее чем 20000 нг/мл, предпочтительно менее чем 18000 нг/мл, менее чем 3000 нг/мл, менее чем 1000 нг/мл, менее чем 500 нг/мл или менее чем 400 нг/мл.

Антитела по изобретению также могут подавлять сигнализацию NfκB, опосредованную IL-36 (фиг.11). Предпочтительно они подавляют передачу сигналов NfκB, опосредованную IL-36, с EC50 менее чем 100 нг/мл, предпочтительно менее 50 чем нг/мл, менее чем 40 нг/мл, менее чем 30 нг/мл, менее чем 20 нг/мл или менее чем 15 нг/мл.

Авторами изобретения неожиданно было обнаружено, что антитела по изобретению подавляют высвобождение цитокинов, опосредованное различными стимулами. Например, антитела подавляют высвобождение цитокинов, опосредованное IL-1α, IL-33 и IL-36α. Результаты для выбранного антитела показаны на фиг.12. Например, антитело MAV-16-0030 подавляет высвобождение цитокинов, опосредованное всеми тремя стимулами, при этом IL-1Ra влияет только на высвобождение цитокинов, опосредованное IL-1α.

Заболевания, связанные с острым или хроническим воспалением, поддерживаются или развиваются в условиях воздействия множества цитокинов, действующих либо одновременно, либо последовательно. Ранние «тревожные сигналы», такие как IL-1α и IL-33, могут запускать другие цитокины, включая IL-1β и IL-36, таким образом формируя сильную воспалительную среду. Следовательно, сопутствующее подавление сигнализации, опосредованной многочисленными цитокинами, обеспечивает эффективный контроль воспалительных процессов. Ключевым аспектом антител по изобретению является то, что они подавляют передачу сигналов от множества цитокинов путем блокирования рецептора IL1R3.

Связывание антител с иммунными клетками может приводить к истощающим и губительным эффектам, например, путем прямой индукции апоптотических сигнальных путей, стимуляции избыточного высвобождения цитокинов или эффекторной функции антитела, антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности

(ADCC). Следовательно, еще один аспект антител по изобретению заключается в том, что они не индуцируют истощение иммунных клеток, опосредованное прямой индукцией апоптотических сигнальных путей, стимуляцию чрезмерного выделения цитокинов или эффекторную функцию антитела, антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.

Важно отметить, что антитела по изобретению не влияют на жизнеспособность иммунных клеток. Например, они не влияют на жизнеспособность человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), и не индуцируют высвобождение IL-6 в PBMC (см. Фиг.13).

Антитела по изобретению подавляют функциональную активацию высвобождения цитокинов не только в разных клеточных линиях, как описано выше, но также в PBMC или цельных клетках крови доноров. Они подавляют высвобождение цитокинов, опосредованное различными специфическими или комплексными раздражителями. Например, они подавляют активацию PBMC, стимулированных LPS, инактивированных нагреванием *Candida albicans*, IL-12/IL-33 или анти-CD3/CD28 антител (см. Фиг.14 и 15).

Кроме того, в одном из вариантов осуществления гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела по настоящему изобретению способны подавлять высвобождение IFN $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-17 и IL-10 в реакциях смешанной культуры лимфоцитов (см. Фиг.16).

Кроме того, антитела по изобретению особенно полезны для лечения заболеваний, причиной которых является нарушение регуляции мишени, IL1R3.

Следовательно, настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагменту или производному, содержащему по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, для лечения IL-1R3-опосредованного заболевания.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения IL-1R3-опосредованного заболевания у пациента, включающему введение пациенту фармацевтически эффективного количества указанного

антитела или его производного или фрагмента по изобретению.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела, которое специфически связывается с IL-1R3, или его фрагмента или производного, содержащего по меньшей мере часть указанного антитела, которая является достаточной для обеспечения IL-1R3-связывающей специфичности, в соответствии с изобретением.

Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтический носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Композицию по настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будет меняться в зависимости от желаемых результатов. Для введения соединения по изобретению определенными способами введения может потребоваться нанесение покрытия на указанное соединение или совместное введение указанного соединения с материалом, позволяющим предотвратить его инактивацию. Например, соединение может вводиться субъекту в подходящем носителе, например липосомах, или разбавителе. Фармацевтически приемлемые разбавители включают солевые и водные буферные растворы. Фармацевтические носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области.

Фразы «парентеральное введение» и «введенный парентерально», используемые в настоящей заявке, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно осуществляемые путем инъекции, и включают, без

ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Эти композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвратить наличие микроорганизмов можно с помощью процедур стерилизации, см. выше, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Также возможно включение в композицию изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, длительная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть получена путем включения агентов, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин. Независимо от выбранного способа введения соединения по настоящему изобретению, которые могут быть использованы в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят в состав фармацевтически приемлемых лекарственных форм обычными способами, известными способами в данной области техники. Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут меняться для получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, для конкретной композиции и способа введения, при этом они не должны быть токсичными для пациента. Выбранный уровень дозирования будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность используемых конкретных композиций по настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предыдущую

историю болезни пациента, получающего лечение, и аналогичные факторы, хорошо известные в области медицины.

Одним из аспектов изобретения является фармацевтическая композиция по изобретению для применения для лечения рака, как определено в настоящей заявке.

Другим аспектом изобретения является способ лечения IL-1R3-опосредованного заболевания у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по изобретению.

Такие IL-1R3-опосредованные заболевания могут включать рак. Согласно литературным источникам, отрицательный прогноз и прогрессирование рака связаны с увеличением уровней IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-36 и/или повышенной экспрессией IL-1R3.

Термин «рак», используемый в настоящей заявке, может представлять собой, например, рак легких, немелкоклеточный рак легких, бронхоалоальвеолярный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, мезотелиому, гепатоцеллюлярный рак, рак желчного протоков, злокачественные опухоли центральной нервной системы (ЦНС), опухоли позвоночника, глиому ствола головного мозга, мультиформную глиобластому, астроцитому, шванному, эпендимому, медуллобластому, менингиому, плоскоклеточный рак, аденому гипофиза, лимфому, лимфоцитарную лейкемию, в том числе рефрактерные варианты любого из указанных выше видов рака, или комбинацию одного или более из вышеуказанных видов рака. Предпочтительно такой рак представляет собой лейкемию, рак



молочной железы, рак толстой кишки, рак легких или рак поджелудочной железы. Наиболее предпочтительно рак представляет собой лейкемию.

В одном из вариантов осуществления IL-1R3-опосредованное заболевание выбирают из группы, состоящей из лейкемии, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легких, рака поджелудочной железы, рака печени, немелкоклеточного рака легких, колоректального рака, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, эстроген-рецептор-положительного рака молочной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, мезотелиомы, рака желчного пузыря, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака простаты, рака щитовидной железы, болезни Ходжкина, лимфомы MALT, рака слюнной железы или меланомы.

Некоторые виды опухолей могут быть вызваны или стимулированы клетками микроокружения опухоли, секретирующими воспалительные цитокины, такие как IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-36. В некоторых случаях экспрессия таких цитокинов приводит к развитию устойчивости к опухоли. Сопутствующее использование ингибиторов цитокинов и противораковых соединений значительно улучшает скорость ответа таких методов лечения или может нарушить устойчивость к опухолям. Это обеспечивается настоящим изобретением, поскольку достигается широкий спектр подавления индуцированной цитокинами сигнализации. Такая активность по показаниям рака достигается не за счет прямой истощающей активности раковых клеток, а за счет подавления связанного с раком воспаления через модуляцию IL1R3 сигнальных путей. Антитела по настоящему изобретению обеспечивают очень предпочтительный профиль активности, поскольку они обеспечивают эффективное подавление хронического воспаления, связанного с раком, и в то же время не вызывают нежелательных побочных эффектов, поскольку не проявляют эффекторную функцию антитела и, таким образом, не влияют на жизнеспособность целевых клеток, экспрессирующих IL-1R3.

Поэтому в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело или фармацевтическая композиция

используется для лечения пациентов, которые имеют опухоль, такую как солидная опухоль, и имеют недостаточную реакцию или опухоль, устойчивую к цитотоксической, цитостатической или целенаправленной/иммунотерапии.

В одном из аспектов изобретения гуманизованное антитело и/или фармацевтическая композиция по изобретению предназначена для применения для лечения рака в комбинации с одним или более цитотоксическими, цитостатическими или целевыми противораковыми соединениями. Применение ингибиторов цитокинов и цитотоксических, цитостатических или целевых противораковых соединений значительно улучшает скорость ответа таких методов лечения или может нарушить устойчивость к опухолям.

В таких аспектах изобретения рак предпочтительно выбирают из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака печени, рака легких (ассоциированного с воспалением, вызванным асбестозом, инфекциями, курением, кремнеземом), немелкоклеточного рака легких, колоректального рака/рака, ассоциированного с колитом (ассоциированного с воспалительным заболеванием кишечника), рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, эстроген-рецептор-положительного рака молочной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, мезотелиомы, рака желчного пузыря (ассоциированного с хроническим холециститом, ассоциированным с камнями в желчном пузыре), рака яичников, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, ассоциированного с инфекцией *E.coli* рака предстательной железы, рака щитовидной железы, болезни Ходжкина, лимфомы MALT, рака слюнных желез, меланомы, эндометриоз-ассоциированной карциномы эндометрия, рака пищевода, связанного с эзофагитом Барретта.

В одном из аспектов способа по настоящему изобретению антитело IL1R3 или фармацевтическую композицию по изобретению вводят одновременно с одним или более цитотоксическими, цитостатическими или целевыми противораковыми агентами. В другом аспекте антитело или фармацевтическую композицию вводят последовательно с одним или более цитотоксическими, цитостатическими или целевыми противораковыми агентами.

В последнем случае предпочтительно, чтобы антитело вводили

после лечения одним или более цитотоксическими, цитостатическими или целевыми противораковыми агентами.

Цитотоксические или цитостатические агенты по изобретению могут представлять собой таксаны, антрациклины, алкилирующие агенты, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы киназы, нуклеотидные аналоги, пептидные антибиотики, агенты на основе платины и ингибиторы контрольных точек.

Предпочтительно целевые противораковые агенты выбирают из одного из следующих соединений или их комбинаций: анти-EGFR соединений, таких как цетуксимаб, гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, панитумумаб, и анти-HER2 соединений, таких как трастузумаб, адо-трастузумаб эмтанзин, пертузумаб.

Кроме того, предпочтительно, чтобы целевые противораковые агенты были ингибиторами контрольных точек. Они могут представлять собой, без ограничения, анти-PD1 соединения, такие как пембролизумаб и ниволумаб, и анти-PDL1 соединения, такие как атезолизумаб, авелумаб и дурвавумаб, и анти-CTLA-4 соединения, такие как ипилимумаб и тремелимумаб.

#### **ПРИМЕРЫ**

Приведенные ниже примеры описаны в комбинации с чертежами и таблицами для иллюстрации изобретения.

**Пример 1: Определение антител, специфических к P013\_03 (человеческий IL-1R3), в супернатантах В-клеток**

#### **Принцип анализа:**

384-луночные микротитровальные планшеты NUNC Maxisorp покрывают P013\_03. После блокирования обеспечивают связывание специфических антител из В-клеточных супернатантов с антигеном и затем детектируют с помощью POD-меченого антитела. Образцы оценивали при разведении 1:2.

#### **Материалы:**

Планшеты: 384-луночные планшеты NUNC Maxisorp; номер по каталогу № 464718

Белки: P013-03 (конц. 1,5 мг/мл, концентрация для анализа 0,5 мкг/мл)

Стандартное Аб: P013-02 (конц. 1 мг/мл, исходная концентрация для анализа 2 мкг/мл)

Идентифицирующее Ab: антикроличий IgG, связанное с пероксидазой видоспецифическое полное антитело (от осла) (ECL); GE; номер по каталогу № NA9340; разведение для анализа: 1:5000

PBS: Буферы в упаковке, предварительно смешанный PBS буфер, 10x; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 11666789001

BSA: фракция V альбумина бычьей сыворотки из бычьей сыворотки; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 10735086001

Твин 20: Твин 20; Carl Roth; номер по каталогу № 9127.2

TMB: раствор TMB; Life Technologies; номер по каталогу № SB02

HCl: 1M соляная кислота Titripur; Merck; номер по каталогу № 1090571000

Буфер ELISA: PBS, 0,5% BSA, 0,05% Твин

Промывочный буфер: PBS, 0,1% Твин

Блокирующий буфер: PBS, 2% BSA, 0,05% Твин

Образцы: разведение 1:2 в буфере ELISA

#### **Процедура:**

1. Добавляют 12,5 мкл P013-03 (0,5 мкг/мл) в PBS в 384-луночном планшете NUNC Maxisorp и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

2. Промывают 3 раза 90 мкл промывочного буфера.

3. В каждую лунку добавляют 90 мкл блокирующего буфера и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

4. Промывают 3 раза промывочным буфером.

5. Добавляют 12,5 мкл стандартного антитела с разведением 1:2 или образец, разведенный 1:2 буфером ELISA, и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

6. Промывают 3 раза промывочным буфером.

7. Добавляют 12,5 мкл 1:5000 POD-антитела в буфере ELISA и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

8. Промывают 6 раз промывочным буфером.

9. Добавляют 15 мкл TMB.

10. Добавляют 15 мкл HCl после развития окрашивания достаточной интенсивности.

11. Измеряют поглощение при 450 нм/620 нм.

**Пример 2: Идентификация P013-специфических антител, ингибирующих P013-рецептор, с помощью технологии репортера Люциферазы**

**Принцип анализа:**

293T/17-FR-клетки, экспрессирующие репортер люциферазы NF-kB-RE светлячков, высевает в планшеты для клеточных культур, покрытые поли-D-лизин. После стимуляции P013 тестируют лизат 293T/17-FR на присутствие активированного NF-kB с помощью набора для анализа люциферазы Steady-Glo. Обеспечивают связывание супернатантов, содержащих функциональные антитела, с P013 и подавляют активацию NF-kB, что проявляется в виде низкого сигнала. Образцы оценивали при разведении 1:2 в растворе P013.

**Материалы:**

Планшеты: клеточные планшеты: 384-луночные планшеты для клеточных культур PDL Costar; номер по каталогу № 3844

Планшеты для анализа: 384-луночные белые планшеты Lumitrac; Corning; номер по каталогу № 3572

Клетки: 293T/17-FR; концентрация для анализа 250000 клеток/мл

Чем больше номер пассажа клеток, тем ниже сигнал!

Белки: P013\_05 (концентрация 0,03 мг/мл, концентрация для анализа 115 г/мл, рабочая концентрация 230 г/мл)

Стандартное Ab: P013-06 (концентрация 0,2 мг/мл, исходная концентрация для анализа 6 мкг/мл)

Набор: система для люциферозного анализа Steady-Glo; Promega; номер по каталогу № E2510

Среда для клеток: среда DMEM; PAN Biotech; номер по каталогу № P04-04510

FCS: фетальная бычья сыворотка, HyClone; Thermo; номер по каталогу № St30070.03

Среда для 293T/17-FR: среда DMEM, 10% FCS, (+ 20 мкг/мл гигромицин-B, только для культивирования) кондиционированная среда для В-клеток (идентифицирующее МАВ)

Образцы: разведение 1:2 с P013\_05 в среде DMEM+10% FCS

**Процедура:**

1. Процедура культивирования клеточной культуры:

Конфлюэнтные клетки 293T/17-FR отделяют от поверхности с помощью трипсина/ЭДТА (инкубировать только 30 при RT) каждый понедельник (высев:  $5 \times 10^6$  клеток/колба T175) и пятницу (высев:  $3 \times 10^6$  клеток/колба T175).

2. Высевают клетки ( $0,25 \times 10^6$  клеток/мл) в 25 мкл DMEM+10% FCS на 384-луночный планшет PDL (Corning, номер по каталогу № 3844) и инкубируют в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

3. Аспирируют среду и добавляют 12,5 мкл образца или P013\_06 с разбавлением 1:3 в кондиционированной среде или только что кондиционированной среде и инкубируют в течение 30 минут при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> (программа: 3. Аспирация и перенос образцов).

4. Добавляют 12,5 мкл P013\_05 в DMEM+10% FCS и инкубируют в течение 5 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> (программа: 4\_Add P013\_05).

5. Культивируемые клетки уравнивают при комнатной температуре в течение 10 мин.

6. Добавляют 25 мкл реагента Steady-Glo и несколько раз перемешивают пипеткой (программа: 6\_Steady Glo).

7. Выжидают 5 минут до переноса 45 мкл супернатанта в 384-луночный белый планшет Lumitrac (Corning, номер по каталогу № 3572) (программа: 7\_Transfer 45ul).

8. Измеряют люминесценцию с помощью ридера Tecan: Время интеграции: 0,5 сек.

### **Пример 3: Определение специфических антител к huIL1RaP, msIL1RaP, CD134 и CD137 в В-клеточных супернатантах**

#### **Принцип анализа:**

384-луночные микротитровальные планшеты NUNC Maxisorp покрывают целевым белком. После блокирования обеспечивают связывание специфических антител из В-клеточных супернатантов с мишенями и затем детектируют с помощью POD-меченого антитела.

#### **Материалы:**

Планшеты: 384-луночные планшеты NUNC Maxisorp; номер по каталогу № 464718

Белки: расщепленный huIL1RaP (P026\_12; концентрация 0,96 мг/мл; концентрация для анализа 0,25 мкг/мл)

расщепленный muIL1RaP (P026\_13; концентрация 0,93 мг/мл,

концентрация для анализа 0,25 мкг/мл)

расщепленный CD134 (P026\_14; концентрация 0.51 мг/мл, концентрация для анализа 0,25 мкг/мл)

расщепленный CD137 (P026\_15; партия 2; концентрация 1,1 мг/мл, концентрация для анализа 1 мкг/мл)

Стандартное Ab: человеческое анти-IL-1RAcP/IL-1R3 антитело (P013\_6/P026\_08, концентрация 0,2 мг/мл или 0,399 мг/мл, начальная концентрация для анализа 2 мкг/мл, используемая для huIL1RaP и msIL1RaP)

MAV-14-0283 (концентрация 0,6 мг/мл, начальная концентрация для анализа 2 мкг/мл, используемая для CD134)

MAV-14-0285 (концентрация 1 мг/мл, начальная концентрация для анализа 2 мкг/мл, используемая для CD137)

Идентифицирующее Ab: Образцы: антикроличий IgG, связанный с пероксидазой видоспецифический фрагмент Fab<sub>2</sub> (от осла) (ECL); GE; номер по каталогу № NA9340; разбавление для анализа: 1:5000 в буфере ELISA

Для MAV-14-0283 и MAV-0285: связанный с пероксидазой видоспецифический фрагмент Fab<sub>2</sub> античеловеческого IgG (от козы) (HRP); AbD Serotec; номер по каталогу № STAR126P; разбавление для анализа: 1:5000 в буфере ELISA

Для huIL1RaP и msIL1RaP: конъюгированный с пероксидазой ослиный антикозлийный IgG AffiniPure (H+L); Jackson Immuno Research; номер по каталогу № 705-035-003; разбавление для анализа: 1:5000 в буфере ELISA

PBS: Буферы в упаковке, предварительно смешанный PBS буфер, 10x; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 11666789001

BSA: фракция V альбумина бычьей сыворотки из бычьей сыворотки; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 10735086001

Твин 20: Твин 20; Carl Roth; номер по каталогу № 9127.2

TMB: раствор TMB; Invitrogen; номер по каталогу № SB02

HCl: 1M соляная кислота Titripur; Merck; номер по каталогу № 1090571000

Буфер ELISA: PBS, 0,5% BSA, 0,05% Твин

Промывочный буфер: PBS, 0,1% Твин

Блокирующий буфер: PBS, 2% BSA, 0,05% Твин

Образцы: разведение 1:4 в буфере ELISA

**Процедура:**

1. Добавляют 12,5 мкл 0,25 мкл/мл или 1 мкл/мл белка, разбавленного в PBS в 384-луночном планшете NUNC Maxisorp и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
2. Промывают 3 раза 90 мкл промывочного буфера.
3. Добавляют 90 мкл блокирующего буфера в каждую лунку и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
4. Промывают 3 раза 90 мкл промывочного буфера. Планшеты можно хранить в сухом состоянии сроком до 6 недель при температуре 20°C, запечатанными в алюминиевую фольгу.
5. Добавляют 12,5 мкл стандартного антитела с шагом разведения 1:2 или образец (разведенный буфером ELISA) и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
6. Промывают 3 раза 90 мкл промывочного буфера.
7. Добавляют 12,5 мкл 1:5000 POD-антитела в буфере ELISA и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
8. Промывают 6 раз 90 мкл промывочного буфера.
9. Добавляют 15 мкл ТМВ.
10. Добавляют 15 мкл HCl после 15 мин окрашивания.
11. Измеряют поглощение при 450 нм/620 нм.

**Пример 4: Подавление экспрессии NFκB стабильно трансфицированными клетками A549-NFκB-RE-Luc после стимуляции IL-1 (α/β)**

**Принцип анализа:**

Стабильно трансфицированные клетки A549-NFκB-RE-Luc (Signesis) вносят пипеткой в 384-луночный планшет и инкубируют в течение ночи. На 2-й день обеспечивают связывание анти-IL1R3 антител с стабильно трансфицированными клетками A549-NFκB-RE-Luc, которые затем стимулируют добавлением IL-1 (α или β). Это приводит к транскрипции гена люциферазы, обусловленной активацией сигнального пути NFκB, которая может быть измерена по лизису клеток и путем добавления люциферина.

Проверяют, могут ли антитела подавлять активацию пути NFκB



и, следовательно, понижать люминесцентный сигнал.

**Материалы:**

Планшеты: стерильные 384-луночные белые плоскодонные полистирольные TC-обработанные микропланшеты, с низким бортом; Corning; номер по каталогу № 3570

Белки: IL-1 $\alpha$  (P026\_09); рекомбинантный человеческий IL-1альфа/IL-1F1; 10 мкг/мл; R&D Systems; номер по каталогу № 200-LA-002

IL-1 $\beta$  (P026\_10); рекомбинантный человеческий IL-1бета/IL-1F2; 25 мкг/мл; R&D Systems; номер по каталогу № 200-LB-005

Стандартное Ab: MAB-15-0115; MAB Discovery GmbH; 2,51 мг/мл; рабочая концентрация 10 мкг/мл

Клетки: стабильно трансфицированные клетки A549-NF $\kappa$ B-RE-Luc; Signosis; номер по каталогу № SL-0014

Среда: DMEM; PAN; номер по каталогу № P04-04510

FCS: фетальная бычья сыворотка из Южно-Африканской Республики с низким уровнем IgG; PAN; номер по каталогу № 1552-P120909

Пенициллин/Стрептомицин: 10 000 ед. пенициллин/мл; 10 мг стрептомицин/мл; PAN Biotech; номер по каталогу № P06-07100

Отделяющий агент: Трипсин-ЭДТА 1x; PAN; номер по каталогу № P10-023100 (4 мл для T175/2 мл для T75, ~8 мин 37°C)

Среда для клеток: DMEM, 10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин

Набор детектирования: система для люциферазного анализа Steady-Glo™; Promega; номер по каталогу № E2510

**Процедура:**

1. Культивируют стабильно трансфицированные клетки A549-NF $\kappa$ B-RE-Luc (1,7E+04 клеток/см<sup>2</sup> в течение 3 дней, 2,28E+04 клеток/см<sup>2</sup> в течение 2 дней) в среде для клеток. Не более 10 пассажей!

2. 40000 стабильно трансфицированных клеток A549-NF $\kappa$ B-RE-Luc в 25 мкл среды на лунку (конц=1,6×10<sup>6</sup> клеток/мл) переносят в 384-луночный белый обработанный плоскодонный планшет для клеточных культур.

Инкубируют в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

3. Аспирируют среду из планшета и добавляют 10 мкл образца или стандарта в среде в планшет с помощью робота-пипетки CyBio (программа: «Удаление среды и перенос проб» в папке P026/NFkB). Инкубируют в течение 1 часа при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

4. Добавляют 10 мкл IL-1 ( $\alpha$  или  $\beta$ ) в среде в планшет с помощью робота-пипетки CyBio (программа: «Перенос из резервуара» в папке P026/NFkB) (рабочая концентрация: 0,2 нг/мл, концентрация для анализа: 0,1 нг/мл) и инкубируют 5 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

Перед выполнением этапа 4 растворяют Steady-Glo-подложку в буфере Steady-Glo согласно протоколу Steady-Glo и уравнивают этот раствор и аналитический планшет при комнатной температуре.

5. Добавляют 20 мкл смеси Steady-Glo, тщательно перемешивают, чтобы гарантировать надлежащий лизис клеток. Инкубируют при комнатной температуре, 10 мин.

6. Определяют относительные единицы люминесценции в каждой лунке, используя микропланшетный ридер, установленный на время интеграции, равное 500 мс (программа: Lumineszenz-384).

#### **Пример 5: Секреция IL-6 клетками A549 после стимуляции IL-1 ( $\alpha/\beta$ )**

##### **Принцип анализа:**

Клетки A549 вносят в 384-луночный планшет с помощью пипетки и инкубируют с анти-IL1R3 антителами. Затем клетки стимулируют IL-1 ( $\alpha$  или  $\beta$ ), при этом в среду для анализа секретируется IL-6. Количество IL-6 измеряют методом ELISA.

##### **Материалы:**

Набор для анализа: DuoSet ELISA для человеческого IL-6; номер по каталогу № DY206-05 (R & D Systems); DuoSet состоит из иммобилизованного человеческого анти-IL-6 антитела (часть 840113), антитела, идентифицирующего человеческий IL-6 (часть 840114), человеческого IL-6 (часть 840115) и стрептавидин-HRP (часть 8939755)

Планшеты: 384-луночные прозрачные планшеты для клеточных культур; Corning; номер по каталогу № 3701; 384-луночные планшеты Maxisorp; NUNC; номер по каталогу № 464718

PP-планшет: 120 мкл 384-луночный глубокий прозрачный

планшет «Diamond»; Axygen (Corning); номер по каталогу № P-384-120SQ-C

Белки: IL-1 $\alpha$ ; рекомбинантный человеческий IL-1-альфа/IL-1F1; R&D Systems; номер по каталогу № 200-LA-002

IL-1 $\beta$ ; рекомбинантный человеческий IL-1бета/IL-1F2; R&D Systems; номер по каталогу № 200-LB-005

rhIL1-ra/IL-1F3; R&D Systems; номер по каталогу № 280-PA-010

Стандартное Ab: человеческое анти-IL-1RAC $\beta$ /IL-1R3 антитело; R&D Systems; номер по каталогу № AF676 или AF676-SP

Среда: DMEM; PAN; номер по каталогу № P04-04510

FCS: фетальная бычья сыворотка из Южно-Африканской Республики с низким уровнем IgG; PAN; номер по каталогу № 1552-P120909

Пенициллин/Стрептомицин: 10000 ед. пенициллин/мл; 10 мг стрептомицин/мл; PAN Biotech; номер по каталогу № P06-07100

PBS: Буферы в упаковке, предварительно смешанный PBS буфер, 10x; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 11666789001

BSA: фракция V альбумина бычьей сыворотки из бычьей сыворотки; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 10735086001

Твин 20: Твин 20; Carl Roth; номер по каталогу № 9127.2

TMB: раствор TMB; Invitrogen; номер по каталогу № SB02

HCl: 1M соляная кислота Titripur; Merck; номер по каталогу № 1090571000

Буфер ELISA: PBS, 0,5% BSA, 0,05% Твин

Промывочный буфер: PBS, 0,1% Твин

Блокирующий буфер: PBS, 2% BSA, 0,05% Твин

Среда для клеток: DMEM, 10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин

#### **Процедура:**

Стимуляция клеток

1. Вносят 6000 клеток A549 в 25 мкл среды в лунку (концентрация=2,4 $\times 10^5$  клеток/мл) в планшете для культивирования клеток. Инкубируют в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

2. Аспирируют среду из планшета, и добавляют в планшет 12,5

мкл образца или стандарта в среде. Инкубируют в течение 3 часа при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

3. Добавляют 12,5 мкл IL-1 ( $\alpha$  или  $\beta$ ) в планшет (рабочий раствор: 0,2 нг/мл, концентрация для анализа 0,1 нг/мл) и инкубируют 48 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

4. Аспирируют среду и переносят в покрытый и заблокированный планшет ELISA (этап 9). Альтернативно, супернатанты можно хранить при -80°C в PP-планшете в течение одной недели.

#### **Подготовка планшета ELISA**

5. Разбавляют в PBS антитела захвата до концентрации 2 мкг/мл. Сразу вносят антитела захвата в 384-луночный планшет Maxisorp в количестве 12,5 мкл на лунку. Герметично закрывают планшет и инкубируют 1 ч при комнатной температуре.

6. Аспирируют среду из каждой лунки и промывают промывочным буфером, повторяют этот процесс еще два раза, в сумме - три промывки. Промывают путем заполнения каждой лунки промывочным буфером (90 мкл) с помощью автоматического средства для промывки. Полное удаление жидкости на каждом этапе имеет важное значение для хорошей эффективности. После последней промывки удаляют оставшийся промывочный буфер путем аспирации или путем переворачивания планшета и промокания его чистыми бумажными полотенцами.

7. Блокируют планшеты, добавляя в каждую лунку 90 мкл блокирующего буфера. Инкубируют при комнатной температуре в течение минимум 1 часа.

8. Повторяют процесс аспирации/промывки, как на этапе 6. Теперь планшеты готовы для добавления образца. Покрытые и заблокированные планшеты можно хранить при -20°C в сухом состоянии в течение одного месяца.

#### **Процедура анализа**

9. В каждую лунку добавляют 12,5 мкл чистого образца или стандарта IL-6, разбавленного в буфере ELISA (EB). Накрывают крышкой и инкубируют 1 ч при комнатной температуре.

10. Повторяют процесс аспирации/промывки, как на этапе 6 подготовки планшета ELISA.

11. Добавляют в каждую лунку 12,5 мкл детектирующего антитела, разведенного в EB. Накрывают крышкой и инкубируют 1 ч при комнатной температуре.

12. Повторяют процесс аспирации/промывки, как на этапе 6 подготовки планшета ELISA.

13. Добавляют в каждую лунку 12,5 мкл 1:40 разведенного в буфере ELISA стрептавидина-HRP. Накрывают планшет крышкой и инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре. Избегают попадания на планшет прямого света.

14. Повторяют процесс аспирации/промывки, как на этапе 6 подготовки планшета ELISA.

15. Добавляют в каждую лунку 15 мкл раствора субстрата (TMB). Инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре.

16. Добавляют в каждую лунку 15 мкл стоп-раствора (HCl, 1 M). Аккуратно постукивают по планшету, обеспечивая тщательное перемешивание.

17. Сразу определяют оптическую плотность в каждой лунке, используя микропланшетный ридер, установленный на 450 нм. Если имеется коррекция длины волны, устанавливают длину волны 540 нм или 570 нм (программа: TMB stop 384 Cytokine). Результаты считывания, выполненные непосредственно при 450 нм без коррекции, могут оказаться более высокими и менее точными.

#### **Пример 6: Определение характеристик связывания для huIL1RaP-специфических антител с помощью конкурентного анализа**

##### **Принцип анализа:**

384-луночные микротитровальные планшеты NUNC Maxisorp покрывают эталонным антителом Can04. В течение этого времени His-меченный целевой белок предварительно инкубируют со вторым тестируемым антителом и анти-HIS-POD антителом. Затем эту предварительно инкубированную смесь добавляют в аналитический планшет, и по прошествии достаточного времени для развития окрашивания измеряют поглощение при 450 нм/620 нм.

##### **Материалы:**

Планшеты: 384-луночные планшеты NUNC Maxisorp; номер по каталогу № 464718

Ab для покрытия: Can04 (MAB Discovery GmbH, CEP Ab № 184,

концентрация 1 мг/мл, концентрация для анализа 100 нг/мл)

Белок: huIL1RaP-His-белок (P026\_01; Fusion\_1\_Chain\_A гомодимер huIL1RaP-His меченный; GeneArt, концентрация 3 мг/мл, концентрация для анализа - 62,5 нг/мл)

Стандартное Ab: Can04 (см. «Ab для покрытия», исходная рабочая концентрация 3 мкг/мл)

Отрицательный контроль: антитело Her2 (LifeSpan, номер по каталогу LS-C95808/26358, концентрация 225 мкг/мл, исходная рабочая концентрация 3 мкг/мл)

Идентифицирующее Ab: анти-HIS POD антитело (моноклональное анти-полигистидиновое антитело, конъюгированное с пероксидазой, Sigma, № A7058, концентрация 7,5 мг/мл, концентрация для анализа: 3,33 мкг/мл)

PBS: Буферы в упаковке, предварительно смешанный PBS буфер, 10x; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 11666789001

BSA: фракция V альбумина бычьей сыворотки из бычьей сыворотки; Roche Applied Sciences; номер по каталогу № 10735086001

Твин 20: Твин 20; Sigma-Aldrich; номер по каталогу № P1379

TMB: раствор TMB; Merck; номер по каталогу № CL07

HCl: 1M соляная кислота Titripur; Merck; номер по каталогу № 1090571000

Буфер ELISA: PBS, 0,5% BSA, 0,05% Твин

Промывочный буфер: PBS, 0,05% Твин

Блокирующий буфер: PBS, 2% BSA, 0,05% Твин

#### **Процедура :**

12. Готовят смесь для предварительной инкубации, и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.

а. Предварительная инкубация (в 384-луночной планшете)

i. Смешивают 10 мкл серии разбавлений вторичного антитела (разведение 1:2, исходная рабочая концентрация 3 мкг/мл) в буфере ELISA или BLANK с

ii. 10 мкл His-меченого белка (концентрация для анализа 62,5 нг/мл) и

iii. 10 мкл анти-HIS POD антитела (концентрация для анализа: 3,33 мкг/мл), и инкубируют в течение 1 часа при

комнатной температуре.

13. Тем временем покрывают планшет NUNC Maxisorp 20 мкл антитела для покрытия (Can04, концентрация для анализа 100 нг/мл) в PBS и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

14. Промывают 3 раза 90 мкл промывочного буфера.

15. Блокируют 90 мкл блокирующего буфера в течение 1 часа при комнатной температуре.

16. Промывают 3 раза промывочным буфером.

17. Добавляют 20 мкл предварительно инкубированной смеси в ELISA-буфер в течение 1 часа при комнатной температуре.

18. Промывают 6 раз промывочным буфером.

19. Добавляют 25 мкл ТМВ.

20. Добавляют 25 мкл HCl после развития окрашивания достаточной интенсивности.

21. Измеряют поглощение при 450 нм/620 нм.

#### **Пример 7: Обратный скрининг IL12**

##### **Принцип анализа:**

Связывание IL12 используется в качестве обратного скрининга. Белки HER метят линкером, huFc и His (HER1 не имеет His-метки), аналогично белку IL12. Антитела, которые связываются с меткой, являются положительными в обоих анализах, тогда как антигенспецифические антитела связываются только с белками HER, а не с IL12.

##### **Материалы:**

Планшеты: 384-луночные планшеты NUNC Maxisorp; номер по каталогу № 464718

Белки: химера рекомбинантного человеческого IL-12 Rβ1 Fc; R&D Systems; номер по каталогу № 839-B1; концентрация для анализа 0,5 мкг/мл

Стандартное Ab: антитело IL-12Rβета1; GeneTex; номер по каталогу № GTX103917; 1 мг/мл; начальная концентрация для анализа 500 нг/мл (затем разведения 1:2)

Идентифицирующее Ab: связанный с пероксидазой видоспецифический фрагмент Fab2 антикроличьего IgG (от осла) (ECL); GE; номер по каталогу № NA9340; разведение для анализа:

1:5000

Образцы: Разбавление в буфере ELISA зависит от проекта (разбавление 1:2 рекомендуется для высококонцентрированных IgG)

**Процедура:**

1. Добавляют 12,5 мкл 0,5 мкл/мл HER белка в PBS в 384-луночный планшет NUNC Maxisorp и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

2. Промывают 3 раза промывочным буфером.

3. Добавляют 90 мкл блокирующего буфера в каждую лунку и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

4. Промывают 3 раза промывочным буфером. Герметично закрытые алюминиевой фольгой планшеты можно заморозить на несколько недель при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

5. Добавляют 12,5 мкл стандартного антитела с разведением 1:2 или образец, разбавленный в буфере ELISA, и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре (замороженные планшеты следует разморозить незадолго до нанесения образца).

6. Промывают 3 раза промывочным буфером.

7. Добавляют 12,5 мкл 1:5000 POD-антитела в буфере ELISA и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

8. Промывают 6 раз промывочным буфером.

9. Добавляют 15 мкл TMB.

10. Добавляют 15 мкл HCl после развития окрашивания достаточной интенсивности (зависит от проекта, анализ IL12 не короче других анализов).

11. Измеряют поглощение при 450 нм/620 нм.

**Пример 8: Анализ связывания клеток**

Клетки A549 и NIH-3T3 культивировали в DMEM+10% FCS. Клетки HEK-293 культивировали в DMEM+15% FCS, а клетки и SK-MEL-30 - в RPMI+10% FBS. Клетки собирали при помощи Accutax (Sigma), промывали PBS и ресуспендировали в буфере для окрашивания (BD Pharmingen). Анти-IL-1R3 антитела инкубировали с клетками в буфере для окрашивания в течение 30 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  с концентрацией 10 мкг/мл. Для анализа связывания (EC50) клеток SK-MEL-30 клетки инкубировали с серией разведений 1:2, начиная с 20 мкг/мл.



Клетки промывали буфером для окрашивания и инкубировали с козьим античеловеческим вторичным антителом, меченым Alexa-488 (Dianova), в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для окрашивания и ресуспендировали в буфере, содержащем окрашенные мертвые клетки DRAQ7 (Abcam), разведенные 1:100. Клетки анализировали при помощи проточного цитометра Sampler BD Accuri C6. Получали кривую соответствия и рассчитывали EC50, используя Excel (Microsoft) и Xlfit (IDBS).

**Пример 9: Биохимический ELISA анализ человеческого IL-1R3**

384-луночные планшеты Nunc Maxisorp покрывали рекомбинантным Fc-меченым hIL-1R3 (Ser21-Glu359) с концентрацией 0,25 мкг/мл в PBS в течение 60 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза промывочным буфером (PBS 0,1% Твин) и блокировали PBS, 0,2% BSA, 0,05% Твин в течение 60 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером в буфер ELISA (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Твин) добавляли антитела в концентрациях от 6 до 0,03 мкг/мл (серия разведений 1:3) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали промывочным буфером с последующей инкубацией со связанным с пероксидазой видоспецифическим F(ab)<sub>2</sub> античеловеческого IgG (козий, AbD Serotec) с разведением 1:5000 в буфере ELISA в течение 60 минут при комнатной температуре. Перед добавлением раствора субстрата TMB (Invitrogen, 15 мкл/лунку) планшеты промывали шесть раз промывочным буфером. После 5-минутной инкубации добавляли останавливающий раствор (1M HCl, 15 мкл/лунку) и измеряли оптическую плотность (450 нм/620 нм) при помощи планшетного ридера Tecan M1000. Используя Excel (Microsoft) и Xlfit (IDBS), строили кривые соответствия и рассчитывали EC50.

**Пример 10: Анализ функциональной нейтрализации IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$**

A-549-NF $\kappa$ B-RE-Luc (Signosis) культивировали в DMEM, 10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин в течение 5 дней, прежде чем их высевали в 384-луночные белые плоскодонные полистирольные планшеты для клеточных культур (Corning) с плотностью клеток

40000 клеток/лунка в 25 мкл среды. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли аспирацией, и моноклональные или поликлональные (козьи античеловеческие IL-1R3, AF676, R&D Systems) антитела добавляли при различных концентрациях в 10 мкл среды и инкубировали в течение 60 минут при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Рекомбинантные человеческие белки IL-1 $\alpha$  или IL-1 $\beta$  (R&D Systems) добавляли в 10 мкл среды до конечной концентрации 0,1 нг/мл, и планшеты инкубировали в течение 5 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. 20 мкл раствора Steady-Glo™ (Promega) добавляли в каждую лунку, тщательно перемешивали, и планшеты инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре до измерения люминесценции при помощи планшетного ридера Tecan M1000. Используя Excel (Microsoft) и Xlfit (IDBS), строили кривые соответствия и рассчитывали EC50.

**Пример 11: Анализ функциональной нейтрализации IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  - анализ высвобождения IL6 A-549**

Клетки A549 высевали с плотностью 6000 клеток/лунка в 25 мкл среды в 384-луночных обработанных планшетах для клеточных культур (Corning) в среде DMEM, 10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли путем аспирации, а моноклональные или поликлональные (козьи античеловеческие IL-1R3, AF676, R&D Systems) антитела добавляли при различных концентрациях в объеме среды 12,5 мкл и инкубировали в течение трех часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Рекомбинантные человеческие белки IL-1 $\alpha$  или IL-1 $\beta$  (R&D Systems) добавляли в 12,5 мкл среды до конечной концентрации 0,1 нг/мл, и планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. В клеточном супернатанте измеряли секретируемые уровни человеческого IL-6 при помощи набора ELISA DuoSet для человеческого IL-6 (R&D Systems, Cat.No.DY206-05) в соответствии с инструкциями производителя. Используя Excel (Microsoft) и Xlfit (IDBS), строили кривые соответствия и рассчитывали EC50.

**Пример 12: Анализ функциональной нейтрализации IL-33.**

Клетки HEK-Blue™ IL-33 (InvivoGen) культивировали в DMEM,

10% FCS в течение 5 дней, прежде чем их высевали в 384-луночные прозрачные, плоскодонные, обработанные микропланшеты для клеточных культур (Corning) с плотностью 25000 клеток/лунка в 15 мкл среды. В 5 мкл среды добавляли различные концентрации моноклональных или поликлональных (козлиных античеловеческих IL-1R3, AF676, R&D Systems) антител, и планшеты инкубировали в течение 60 минут при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Рекомбинантный человеческий белок IL-33 (R&D Systems) добавляли в 5 мкл среды до конечной концентрации 5 нг/мл, и планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. 5 мкл клеточных супернатантов переносили в прозрачные, плоскодонные полистирольные микропланшеты NBS (Corning), содержащие 20 мкл реактива 2xQUANTI-Blue (InvivoGen). Планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 минут, и измеряли оптическую плотность при 655 нм при помощи планшетного ридера Tecan M1000. Используя Excel (Microsoft) и Xlfit (IDBS), строили кривые соответствия и рассчитывали EC50.

**Пример 13: Анализ функциональной нейтрализации IL-36.**

Клетки HEK293/17-IF (MAB Discovery GmbH) культивировали в DMEM, 10% FCS, 20 мкг/мл гистромицина в течение 5 дней, прежде чем их высевали в 384-луночные белые плоскодонные полистирольные планшеты для клеточных культур (Corning) с плотностью 30000 клеток/лунка в 20 мкл среды. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли аспирацией, и различные концентрации моноклональных или поликлональных (козлиных античеловеческих IL-1R3, AF676, R&D Systems) антител добавляли в объеме 10 мкл среды. Планшеты инкубировали в течение 60 минут при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Рекомбинантный человеческий белок IL-36g (R&D Systems) добавляли в 10 мкл среды до конечной концентрации 15 нг/мл, и планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. 20 мкл раствора Steady-Glo™ (Promega) добавляли в каждую лунку, тщательно перемешивали, и планшеты инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре перед измерением люминесценции при помощи планшетного ридера Tecan M1000. Используя Excel (Microsoft) и Xlfit (IDBS), строили кривые соответствия и рассчитывали EC50.

**Пример 14: Нейтрализация IL-1 $\alpha$ , IL-33 и IL-36 $\alpha$** 

Функции анти-IL-1R3 антител оценивали в отношении сигнализации в трех разных клеточных линиях, используя либо IL-1 $\alpha$ , либо IL-33, либо IL-36 $\alpha$ , для определения воздействия IL-1R3 на сигнальные пути, в которых задействованы три рецептора IL-1 (IL-1R1, -R4 или -R6).

Линию человеческих эпителиальных клеток легкого A549 стимулировали IL-1 $\alpha$  в качестве модели IL-1-зависимых заболеваний, таких как аутовоспалительные заболевания. Клеточную линию культивировали в колбах T75 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в полных средах F-12K (10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин) и отделяли в среднем 2 раза в неделю; количество пассажей до анализа было не более 15. Клетки A549 высевали (50000/лунка) в 96-луночный плоскодонный планшет, выдерживали в течение 3 часов перед предварительной инкубацией в течение 1 ч с MAB-16-0030 (20 мкг/мл - 1 мкг/мл) или IL-1Ra (10 мкг/мл). Затем клетки стимулировали человеческим рекомбинантным IL-1 $\alpha$  (50 мкг/мл, Reprotech) в течение 24 часов до сбора супернатантов и анализа на продуцирование IL-6 (Duoset ELISA, RnD Systems).

Линию человеческих тучных клеток (HMC-1) изучали в отношении IL-33-зависимой индукции продуцирования IL-8. Клеточную линию культивировали в колбах T75 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в полной среде Дульбекко модифицированной по способу Исков (IMDM, 10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин) и отделяли в среднем 3 раза в неделю с плотностью клеток не более 2\*10<sup>6</sup>/мл; при этом количество пассажей до анализа было не более 15. Клетки HMC-1 высевали (30000/лунку) в 96-луночный плоскодонный планшет, выдерживали в течение 3 часов перед предварительной инкубацией в течение 1 часа с MAB-16-0030 (20 мкг/мл - 1 мкг/мл) или IL-1Ra (10 мкг/мл). Затем клетки стимулировали рекомбинантным человеческим IL-33 (20 нг/мл, RnD systems) в течение 24 часов до сбора супернатантов и анализа на продуцирование IL-8 (Duoset ELISA, RnD Systems).

Влияние на сигнализацию IL-36 изучали, используя линии человеческих кератиноцитов (HaCaT). Клеточную линию

культивировали в колбах T75 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в полной среде DMEM (10% FCS, 1% пенициллин/стрептомицин) и отделяли в среднем 3 раза/неделю; при этом количество пассажей до анализа было не более 15. Клетки HaCaT высевали (50000/лунка) в 96-луночный плоскодонный планшет, выдерживали в течение 3 часов перед предварительной инкубацией в течение 1 ч с MAB-16-0030 (20 мкг/мл - 1 мкг/мл) или IL-1Ra (10 мкг/мл). Затем клетки стимулировали рекомбинантным человеческим IL-36 $\alpha$  (50 нг/мл, RnD systems) в течение 24 часов перед сбором супернатантов и анализом на продуцирование IL-8 (Duoset ELISA, RnD Systems).

**Пример 15: Жизнеспособность и высвобождение IL-6 клетками РВМС**

Влияние анти-hIL-1R3 антитела MAB-16-0030 на жизнеспособность нестимулированных РВМС (500000/лунка), полученных от трех здоровых доноров, изучали при помощи обычного анализа снижения МТТ. Вкратце, РВМС (200 мкл) инкубировали либо только с одной средой, либо с MAB-16-0030 (20 мкг/мл). Через 24 часа, 3 и 5 дней РВМС инкубировали в течение 2 часов с МТТ (20 мкл) перед измерением поглощения при 570 нм на ридере ELISA. Используя известную линейность между поглощением и количеством жизнеспособных клеток, преобразующих МТТ, рассчитывали количество жизнеспособных клеток, используя в качестве контроля только одну среду, принимая ее значение за 100%. В день МТТ-анализа супернатанты от РВМС, полученные от тех же доноров и инкубированные в тех же условиях, собирали и затем анализировали на продуцирование IL-6 (Duoset ELISA, RnD systems) для оценки любого возможного стимулирующего эффекта только MAB-16-0030 антитела.

**Пример 16: Функциональное блокирование РВМС**

Для оценки влияния MAB-16-0030 на человеческие клетки, стимулированные различными антигенами, использовали свежесыведенные РВМС от здоровых доноров. Для всех стимулов эксперименты проводили, используя 500000 РВМС/лунка, выполняя стимуляцию в общем объеме 200 мкл. Клетки высевали и инкубировали либо только с одной средой, либо MAB-16-0030 (20-

1,1 мкг/мл), либо IL-1Ra (10 мкг/мл) в течение 1 часа перед стимуляцией. Использовали следующие стимулы; LPS (10 нг/мл, 24 часа, RPMI без FCS), анти-человеческий CD3/CD28 (1,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл (eBioscience) 3 дня, RPMI 10% FCS), IL-12/-33 (2 нг/мл, 20 нг/мл (Peprotech, RnD Systems)) 3 дня, RPM 10% FCS) или инактивированные нагреванием *Candida albicans* ( $0,5 \cdot 10^6$ /мл, 5 дней, RPMI 10% FCS). После стимуляции супернатанты собирали и анализировали методом DuoSet ELISA (RnD Systems) относительно продуцирования цитокинов в соответствии с протоколом производителя.

**Пример 17: Функциональная блокировка иммунных клеток в цельной крови**

Для стимуляции цельной крови использовали инактивированные нагреванием *Candida albicans*. Свежесобранную кровь от здоровых доноров (пробирки с ЭДТА) помещали в микроцентрифужные пробирки (250 мкл/пробирка) и предварительно инкубировали либо только с одной средой (RPMI, без FCS), либо MAB-16-0030 (20-0,1 мкг/мл), либо IL-1Ra (10 мкг/мл) в течение 1 часа перед стимуляцией *Candida albicans* ( $0,5 \cdot 10^6$ /мл) с конечным объемом 1 мл. После 24 ч инкубации (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) супернатанты собирали и анализировали на продуцирование цитокинов методом ELISA (DuoSet, RnD Systems).

**Пример 18: Реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR)**

PBMC от здоровых разных доноров смешивали в соотношении 1:1 (250 000/донор) и инкубировали в течение 5 дней (RPMI, 10% FCS) либо только с одной средой, либо MAB-16-0030 (20-1 мкг/мл), либо IL-1Ra (10 мкг/мл). Продуцирование цитокинов анализировали с помощью мультиплексной платформы Quansys в соответствии с протоколом производителя.

**ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**Фиг.1: Последовательности (аминокислоты, представленные однобуквенным кодом)**

Полные последовательности переменных областей (VR):

Тяжелая цепь: VH полная: SEQ ID NO:1-34 и SEQ ID NO:173

Легкая цепь: VL полная: SEQ ID NO:35-68 и SEQ ID NO:174

Определяющие комплементарность области (CDR):

Тяжелая цепь:

CDRH1: SEQ ID NO:69-85

CDRH2: SEQ ID NO:86-102

CDRH3: SEQ ID NO:103-119

Легкая цепь:

CDRL1: SEQ ID NO:120-136

CDRL2: SEQ ID NO:137-153

CDRL3: SEQ ID NO:154-170 и 175

Константные области (CR):

Легкая цепь: CR-L: SEQ ID NO:171

Тяжелая цепь: CR-H: SEQ ID NO:172

На приведенных ниже фигурах AF676 представляет собой коммерческий препарат поликлонального антитела, приобретенный по следующей ссылке: [https://www.rndsystems.com/products/human-il-1-racpi-il-1-r3-antibody\\_af676](https://www.rndsystems.com/products/human-il-1-racpi-il-1-r3-antibody_af676)

#### **Фиг. 2 ELISA человеческого IL-1R3**

384-луночные микротитровальные планшеты покрывали человеческим белком IL-1R3, презентующим человеческий внеклеточный домен IL-1R3 (0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 час). После этапа интенсивной промывки с последующим этапом блокирования добавляли антитела (12,5 мкл на лунку) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Несвязанное антитело интенсивно промывали. Количество связанного антитела идентифицировали путем инкубации микротитровального планшета с античеловеческим меченым пероксидазой идентифицирующим антителом (1 ч при комнатной температуре). Реакцию пероксидазы инициировали добавлением ТМВ, и измеряли поглощение при 450 нм/620 нм.

Для обеспечения специфического связывания с человеческим IL-1R3, параллельно выполняли обратный скрининг при помощи белка IL12 с идентичными признаками. Параметры анализа были идентичны описанным выше. Супернатанты В-клеток, связывающиеся с IL-1R3 человека, но не с IL12, считались активными.

#### **Фиг. 3: Анализ HEK293 репортеров**

Клетки HEK293T/17-FR стабильно трансфицировали вектором

pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] (Promega) и высевали в 384-луночные планшеты для клеточных культур PDL Costar с последующей инкубацией в течение 30 мин с антителами. Затем клетки стимулировали IL-1 $\beta$  в течение 5 часов перед определением активности NF- $\kappa$ B при помощи набора Steady-Glo (Promega) для люциферазного анализа в соответствии с протоколом производителя.

**Фиг.4: Анализ гена-репортера NF $\kappa$ B люциферазы в стабильной клеточной линии A549**

Стабильно трансфицированные клетки A549-NF $\kappa$ B-RE-Luc (приобретенные у Signosis) культивировали в течение 3 дней ( $1,7E+04$  клеток/см<sup>3</sup>). 384-луночный белые плоскодонные полистирольные ТС-обработанные микротитровальные планшеты (Corning) заполняли  $4 \times 10^4$  клетками на лунку. После культивирования в течение 10 ч клетки инкубировали с антителами в течение 1 часа перед стимуляцией клеток 10 мкл IL-1 $\beta$  еще в течение 5 часов. Модуляцию NF $\kappa$ B измеряли при помощи системы для люциферазного анализа Steady-Glo<sup>TM</sup> (Promega), определяющей относительные единицы люминесценции в каждой лунке по отношению к нестимулированным клеткам.

**Фиг.5: Анализ связывания клеток: связывание с IL-1R3-экспрессирующими клетками**

Гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела оценивали относительно их связывания с клеточными линиями с различными значениями плотности рецепторов IL-1R3 методом проточной цитометрии. Гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела связываются с клеточными линиями с низкими и высокими уровнями экспрессии IL-1R3. Антитела не связываются с мышинными клетками NIH-3T3. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 8.

**Фиг.6: Анализ связывания клеток: связывание клеток в клеточной линии SK-MEL-30 с высоким уровнем экспрессии человеческого IL-1R3**

Значения EC50 связывания клеток для гуманизированных анти-IL-1R3 IgG1-LALA антител определяли путем связывания с клеточной линией SK-MEL-30 с высоким уровнем экспрессии IL-1R3 методом



проточной цитометрии. Гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела MAB-16-0030 и MAB-16-0149 имеют уровень связывания клеток, равный 307 и 306 нг/мл, соответственно. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 8.

**Фиг.7: биохимический ELISA анализ человеческого IL-1R3**

Связывание гуманизированных анти-IL-1R3 IgG1-LALA антител с рекомбинантным человеческим белком IL-1R3 оценивали биохимическим ELISA анализом. Используемые в качестве примера антитела показывают значения связывания EC50, равные 16,3 нг/мл и 29,1 нг/мл, соответственно. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 9.

**Фиг.8: Подавление опосредованной IL-1a и IL-1b сигнализации NfKB в клетках A549-NfKB-RE-Luc**

Функциональную нейтрализацию IL-1a и IL-1b оценивали путем анализа репортерного гена, используя клетки A549-NfKB-RE-Luc, стимулированные 0,1 нг/мл IL-1a и IL-1b, соответственно. Гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела имеют значения EC50, превосходящие значения козлиных античеловеческих IL1-R3 поликлональных антител AF776 (R&D Systems). Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 10.

**Фиг.9: анализ функциональной нейтрализации IL-1a и IL-1b: Подавление опосредованного IL-a и IL-1b высвобождения IL-6 клетками A-549**

Нейтрализацию опосредованного IL-a и IL-1b высвобождения IL-6 гуманизированными анти-IL-1R3 IgG1-LALA антителами оценивали, используя клетки A-549. Значения EC50 показывают, что гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела превосходят активность козлиных античеловеческих IL-1R3 поликлональных антител AF676 (фиг. R&D Systems). Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 11.

**Фиг.10: Анализ функциональной нейтрализации IL-33: Подавление опосредованной IL-33 сигнализации Nfkb в клетках HEK-Blue-IL33TM**

Нейтрализацию опосредованной IL-33 клеточной сигнализации гуманизированными анти-IL-1R3 IgG1-LALA антителами оценивали,

используя стимулированные IL-33 клетки HEK-Blue-IL33™, содержащие репортерный ген (InvivoGen). EC50 демонстрируют, что гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела превосходят активность козлиных античеловеческих IL-1R3 поликлональных антител AF676 (фиг. R&D Systems). Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 12.

**Фиг. 11: Анализ функциональной нейтрализации IL-36: Подавление опосредованной IL-36 сигнализации NfκB в клетках HEK-293/17-IF**

Нейтрализацию опосредованной IL-36 клеточной сигнализации гуманизированными анти-IL-1R3 IgG293-LALA антителами оценивали, используя стимулированные IL-33 клетки HEK-Blue-IL33™, содержащие репортерный ген (InvivoGen). Гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела имеют значения EC50, превосходящие значения козлиных античеловеческих IL1-R3 поликлональных антител AF776 (R&D Systems). Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 13.

**Фиг. 12: Нейтрализация выделения клеточных цитокинов, опосредованного IL-1α, IL-33 и IL-36α**

Нейтрализацию клеточного высвобождения цитокинов, опосредованного IL-1α, IL-33 и IL-36α, оценивали с помощью специфических IL-1α, IL-33 и IL-36α-зависимых клеточных систем. Подавление высвобождения цитокинов типичным гуманизированным анти-IL-1R3 IgG1-LALA антителом по настоящему изобретению (MAV-16-0030) оценивали и сравнивали с IL-1Ra. При том, что антитело по изобретению способно подавлять выделение цитокинов, опосредуемое всеми тремя стимулами, IL-1Ra влияет только на высвобождение IL-1α-опосредованного цитокина. Эксперименты проводили согласно способу, описанному в примере 14.

**Фиг.13: Жизнеспособность и высвобождение IL-6 нестимулированными PBMC, обработанными гуманизированным анти-IL-1R3 IgG1-LALA антителом**

Связывание антител с иммунными клетками может приводить к истощающим и губительным эффектам, например, путем прямой индукции апоптотических сигнальных путей, стимуляции избыточного высвобождения цитокинов или эффекторной функции антитела,

антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Чтобы исключить факт непосредственного влияния гуманизированного анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела на жизнеспособность РВМС, жизнеспособность РВМС, полученных от трех доноров, и высвобождение IL-6 исследовали после инкубации с различными концентрациями типичного гуманизированного анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела по изобретению (МАВ-16-0030) в течение 1, 3 и 5 дней. МАВ-16-0030 не повлияло ни на жизнеспособность, ни на высвобождение IL-6. Эти результаты подтверждают, что гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела блокируют функцию IL-1R3 на иммунных клетках не приводя к существенному истощению клеток и не вызывая вредные эффекты на клеточном уровне. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 15.

**Фиг.14: Функциональное блокирование РВМС, активированных различными раздражителями**

Для определения, подавляют ли гуманизированные анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитела активацию РВМС, стимулированных специфическими или комплексными стимулами, РВМС, полученные от 10 доноров, стимулировали ЛПС, инактивированными нагреванием *Candida albicans*, IL-12/IL-33 или анти-CD3/CD28. Типичное гуманизированное анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитело по изобретению способно подавлять выделение цитокинов, опосредованное всеми тестируемыми стимулами. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 16.

**Фиг.15: Функциональное блокирование иммунных клеток в цельной крови, активированной *Candida albicans***

Чтобы проверить, подавляет ли гуманизированное анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитело активацию иммунных клеток в цельной крови, цельную кровь, полученную от 8 доноров, стимулировали инактивированными нагреванием *Candida albicans*. Типичное гуманизированное анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитело по изобретению, показанное на чертеже, способно подавлять индуцированное *Candida* высвобождение цитокинов IL-6. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 17.

**Фиг.16: Блокирование выделения цитокинов в реакциях**

**смешанных лимфоцитов (MLR)**

Способность гуманизированных анти-IL-1R3 IgG1-LALA антител блокировать выделение различных цитокинов оценивали в реакциях смешанных лимфоцитов (MLR), используя PBMC, полученные от здоровых, разных доноров. Типичное гуманизированное анти-IL-1R3 IgG1-LALA антитело по изобретению, показанное на чертеже, способно подавлять высвобождение IFN $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-17 и IL-10. Эксперименты проводили в соответствии со способом, описанным в примере 18.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Гуманизированное антитело, которое специфически связывается с IL-1R3, или его IL-1R3связывающий фрагмент, содержащее:

(1) CDR1H с SEQ ID NO: 77, CDR2H с SEQ ID NO: 94, CDR3H с SEQ ID NO: 111, CDR1L с SEQ ID NO: 128, CDR2L с SEQ ID NO: 145 и CDR3L с SEQ ID NO: 162 и дополнительно содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 80% идентична VH-области с SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80% идентична VL-области с SEQ ID NO: 60;

(2) CDR1H с SEQ ID NO: 79, CDR2H с SEQ ID NO: 96, CDR3H с SEQ ID NO: 113, CDR1L с SEQ ID NO: 130, CDR2L с SEQ ID NO: 147 и CDR3L с SEQ ID NO: 175, и дополнительно содержащие переменную область тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 80% идентична VH-области с SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80% идентична VL-области с SEQ ID NO: 174, и

(3) CDR1H с SEQ ID NO: 81, CDR2H с SEQ ID NO: 98, CDR3H с SEQ ID NO: 115, CDR1L с SEQ ID NO: 132, CDR2L с SEQ ID NO: 149 и CDR3L с SEQ ID NO: 166 и дополнительно содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 80% идентична VH-области с SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80% идентична VL-области с SEQ ID NO: 64.

2. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, где гуманизированное антитело или его фрагмент ингибирует активность NFκB, индуцированную IL-1R3.

3. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело ингибирует активность NFκB, стимулируемую IL-1α, IL-1β, IL-33 и/или IL-36.

4. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело ингибирует активность NFκB, стимулируемую комплексом, выбранным из группы, состоящей из IL-1β/IL-1R1/IL-1RAcP, IL-1α/IL-1R1/IL-1RAcP, IL-33/ST2/IL-1RAcP, и/или IL-36/IL-36R/IL-1RAcP.

5. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело или его фрагмент ингибирует в концентрации 10 мкг/мл экспрессию NFκB в лизатах клеток A549-NFκB-RE-Luc, стимулированных 0,1 нг/мл IL-1альфа человека, IL-1бета человека, IL-33 и/или IL-36, на 50% или более, на 60% или более, на 70% или более, на 80% или более, на 90% и более или на 95% или более, касательно того же анализа без указанного антитела по изобретению.

6. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело или его фрагмент ингибирует IL-1альфа, IL-1бета, IL-33 и IL-36, соответственно, стимулирует активность люциферазы в клетках HEK293T/17, трансфицированных люциферазой, под контролем репортерного гена NF-κB.

7. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело или его фрагмент содержит по меньшей мере аминокислотные замены в L234A и L235A Fc-области IgG1 человека или S228P и L235E Fc-области IgG4 человека.

8. Применение гуманизированного антитела или его фрагмента по любому из предшествующих пунктов для лечения рака.

9. Применение гуманизированного антитела или его фрагмента по п.8, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), бронхиолоальвиолярного клеточного рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной меланомы, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака толстой кишки, рака молочной железы и рака матки.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента по любому из пп.1-7.

11. Применение фармацевтической композиции по п.10 для лечения рака, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCL), бронхиолоальвиолярного клеточного рака легкого, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной меланомы, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака толстой кишки, рака молочной железы или рака матки.

12. Применение фармацевтической композиции по п.10 для

лечения рака в комбинации с одним или более цитотоксическими, цитостатическими или целевыми противораковыми соединениями.

По доверенности

**ФИГ. 1** Последовательности (аминокислоты, представленные однобуквенным кодом)

VH полная: SEQ ID NO: 1-34 и SEQ ID NO: 173  
 VL полная: SEQ ID NO: 35-68 и SEQ ID NO: 174

CDR-H1: SEQ ID NO: 69-85  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 86-102  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 103-119

CDR-L1: SEQ ID NO: 120-136  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 137-153  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 154-170 и 175

CR-L: SEQ ID NO: 171  
 CR-H: SEQ ID NO: 172

Название mAb	SEQ ID NO.	Полная последовательность VR тяжелой цепи
<b>MAV-15-0139</b>	1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVSCIYTGSGGTY YASWEKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPGYSSWLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0106</b>	2	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSHYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGN TYYANWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDASSSGSWDLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0108</b>	3	EVQLEESGGRLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEYSVITSSATYYAS WAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARGGPGYSTNTHYAFDPWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0110</b>	4	EVQLEESGGRVVQPGRSLRLSCAVSGIDL DNYAMGWVRQAPGKGLEVAVISSD GFFYD ASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRGTSTGSLDLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0117</b>	5	EVQLEESGGRLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSASTYYAT WAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARTHAAVAGYGYASRLDLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0121</b>	6	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNYWICWVRQAPGKGLELVSCIYTGSTGNTW YASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLLVVT SFNLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0140</b>	7	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGV TYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASET DGN YFNLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0115</b>	8	EVQLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSY WRCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSGDV TYYANWVNGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVGFGYFNLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0125</b>	9	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIFIGYGDVT WYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARALGSSGYRVNLWGQGLTVTVSS
<b>MAV-15-0119</b>	10	EVQLEESGGRLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWMSWVRQAPGKGLEWVSMIYGSGYTY ASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPQYFILWGQGLTVTVSS



<b>MAB-15-0109</b>	11	EVQLEESGGRLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTIYIGGTTAYA SWPKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLQGANYYNSLALWGQGTLTVSS
<b>MAB-15-0097</b>	12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSNYMCWVRQAPGKGLELVSCIYTNNGNT WSASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLNYPDTSNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-15-0135</b>	13	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSSFGYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYGDSSDT LYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARYPGGSYYNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-15-0133</b>	14	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSSSTYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGST YYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDGSSSGSWDLWGQGTLTVSS
<b>MAB-15-0107</b>	15	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGISFSSDFMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSVSI YYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARSTGSGVGRGFNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-15-0128</b>	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSIYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYTGNSDFT YYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARFRDDYASLKLWGQGTLTVSS
<b>MAB-15-0116</b>	17	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSYDMCWVRQAPGKGLEWVSCIYTGSGST YYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARNSNDWMYFNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0004</b>	18	EVQLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVACIYTGSGGT YYASWEKGRFTISKTSSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPGYSSWLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0009</b>	19	EVQLEESGGDLVQPGASLRLSCAASGFSSSHYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGN TYANWAKGRFTISKTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDASSSGSWDLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0028</b>	20	EVQLLES GGRLVQPGTSLRLSCAVSGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEVGVITSSATTYYAS WAKGRFTISKTSSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARGGPGYSTNTHYAFDPWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0031</b>	21	EVQLEESGGRRVQPGTSLRLSCAVSGIDLNYAMGWVRQAPGKGLEVAVISSDGFYD ASWAKGRFTISKANSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRGTSTGSLDLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0043</b>	22	QVQLEESGGRLVQPGTSLRLSCAASGFSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWVAIISGSASTYYA TWAKGRFTISKTSSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARTHAAVAGYGYASRLDLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0049</b>	23	QVQLQESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSSNYWICWVRQAPGKGLELVACIYTGNT WYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLLVTSFNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0045</b>	24	EVQLVESGGDLVQPGASLRLSCAASGFSSSYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGV TYASWAKGRFTISDTSSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASETGNFYFNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0040</b>	25	EVQLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSYWRCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSGD VTYYANWVNGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASGVGFGYFNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0036</b>	26	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSYYMCWVRQAPGKGLEWVACIFIGYGDVT WYASWAKGRFTISKANSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARALGSSGYRVNLWGQGTLTVSS
<b>MAB-16-0046</b>	27	QVQLEESGGRLVQPGASLRLSCAASGFSLSSYMSWVRQAPGKGLEWVAMIYGSYTY YASWAKGRFTISTSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPQYFILWGQGTLTVSS

<b>MAB-16-0030</b>	28	EVQLEESGGRLVQPGTSLRLSCAVSGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTIYIGGTTAYA SWPKGRFTISKNTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLQGANYYNSLALWGQGLTVVS S
<b>MAB-16-0021</b>	29	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSNYMCWVRQAPGKGLELVACIYTNNGNT WSASWAKGRFTISKNTSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLNYPDTSNLWGQGLTVVS S
<b>MAB-16-0019</b>	30	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSGFYMCWVRQAPGKGLEWVACIYGDSSDT LYANWAKGRFTISKNTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARYPGGSYNLWGQGLTVVS S
<b>MAB-16-0015</b>	31	QVQLQESGGDLVQPGASLRLSCAASGFSFSSTYYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGS TYYASWAKGRFTISKNSSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDGSSSGSWDLWGQGLTVV SS
<b>MAB-16-0027</b>	32	EVQLEESGGDLVQPGASLRLSCAASGISFSSDFMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSVSI YYATWAKGRFTISKASSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARSTGSGVGRGFNLWGQGLTVVS S
<b>MAB-16-0048</b>	33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSIIYMCWVRQAPGKGLEWVGCITGNPDF TYYANWAKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARFRDDYASLKLWGQGLTV VSS
<b>MAB-16-0041</b>	34	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWVGCITGSGS TYYANWAKGRFTISKDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARNSNDWYFNLWGQGLTV TVSS

Название mAb	SEQ ID NO.	Полная последовательность VR k-легкой цепи
<b>MAB-15-0139</b>	35	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASESISNYLSWYQQKPGQAPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNWVIEHNGAAFSGGKTKVVIK
<b>MAB-15-0106</b>	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASESIYSNLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSASYSTGPDWTFGQGTQKVIK
<b>MAB-15-0108</b>	37	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSIYIYLSWYQQKPGQAPKLLIYDASKLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGATTYNVDNVFGQGTQKVIK
<b>MAB-15-0110</b>	38	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASENIGNGLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCTYWNPDYIGGAFSGGKTKVVIK
<b>MAB-15-0117</b>	39	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASEDIYSGISWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYSYNTGPTFGQGTQKVEIK
<b>MAB-15-0121</b>	40	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLGVCTDISTDDLNAFGQGTQKVIK
<b>MAB-15-0140</b>	41	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLGVYTYSTDIHAFSGGKTKVVIK
<b>MAB-15-0115</b>	42	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLGVYTHISADNAFGGKTKVVIK
<b>MAB-15-0125</b>	43	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASENIYSSLAWYQQKPGQAPKLLIYDASDLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYSSGTDNDVFGGKTKVVIK
<b>MAB-15-0119</b>	44	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSQSVGDGNLLSWYQQKPGQAPKLLIYDASNLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGSYSSSWYNVFGQGTQKVIK
<b>MAB-15-0109</b>	45	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSIYFSLWYQQKPGQAPKLLIYAASDLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCNIIIDYGAFGGKTKVVIK

MAB-15-0097	46	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGYYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYNSDSDAFGQGTQKVVIK
MAB-15-0135	47	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTISINLAWYQQKPGQAPKLLIYASTLASGVPSRF SGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQGYTEDNIDNTFGQGTQKVVIK
MAB-15-0133	48	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYNSLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQGAVYSGNTEWAFGQGTQKVVIK
MAB-15-0107	49	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNSNHLWSYQQKPGQAPKLLIYASTLASGVP SRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQGEFSCVSADCFGGGTQKVVIK
MAB-15-0128	50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGQAPKLLIYGASNLASGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQCTYYDNNYGGAFGGGTQKVVIK
MAB-15-0116	51	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESISANYWSWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPS RFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYFCQSWYYSGSGSYHSAWAFGQGTQKVVIK
MAB-16-0004	52	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESISNYLSWYQQKPGQAPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQNWVIEHNGAAFGGGTQKVVIK
MAB-16-0009	53	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESIYNSLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSRF SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQSASYSTGPDWTFGQGTQKVVIK
MAB-16-0028	54	AIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIYIYLSWYQQKPGQAPKLLIYDASKLASGVPSRF SGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQGATTYNVDNVFGQGTQKVVIK
MAB-16-0031	55	ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIGNGLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPS RFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQCTYWNPDYIGGAFGGGTQKVVIK
MAB-16-0043	56	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEDIYSGISWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRF GSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLGGYSYSNTGPTFGQGTQKVEIK
MAB-16-0049	57	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYNSLAWFQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTITISLQPEDFATYYCLGVCTDISTDDLNAFGQGTQKVVIK
MAB-16-0045	58	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYNSLAWFQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTITISLQPEDFATYYCLGVYTYSTDIHAFGGGTQKVVIK
MAB-16-0040	59	ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYNSLAWFQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTITISLQPEDFATYYCLGVYTHISADNAFGGGTKVEIK
MAB-16-0036	60	ALQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIYSSLAWYQQKPGQAPKLLIYDASDLASGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQGYSSGTDNDVFGGGTKVVIK
MAB-16-0046	61	NIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVGDGNLLSWYQQKPGQAPKLLIYDASNLAGV PSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQGSYSSSWYNVFGQGTQKVVIK
MAB-16-0030	62	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIYSFLSWYQQKPGQAPKLLIYAASDLESGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQCNIIIDYGAFGQGTQKVVIK
MAB-16-0021	63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGYYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYNSDSDAFGQGTQKVVIK
MAB-16-0019	64	AIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTISINLAWYQQKPGQAPKLLIYASTLASGVPSRF SGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQGYTEDNIDNTFGQGTQKVVIK
MAB-16-0015	65	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYNSLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQGAVYSGNTEWAFGQGTQKVVIK
MAB-16-0027	66	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNSNHLWSYQQKPGQAPKLLIYASTLASGVP SRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQGEFSCVSADCFGGGTQKVVIK
MAB-16-0048	67	DVVMQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGQAPKLLIYGASNLASGVPSR FSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQCTYYDNNYGGAFGGGTQKVEIK
MAB-16-0041	68	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESISANYWSWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPS RFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYFCQSWYYSGSGSYHSAWAFGQGTQKVVIK



MAB-15-0128	MAB-16-0048	84	SIYYMC	101	CIYTGNSDFTYYANWAKG	118	FRDDYASLKL
MAB-15-0116	MAB-16-0041	85	SGYDMC	102	CIYTGSGSTYYANWAKG	119	NSNDWMYFNL

Название mAb		SEQ ID NO.	CDR-L1	SEQ ID NO.	CDR-L2	SEQ ID NO.	CDR-L3
MAB-15-0139	MAB-16-0004	120	QASESISNYLS	137	LASTLAS	154	QNWWVIEHNGAA
MAB-15-0106	MAB-16-0009	121	QASESIYSNLA	138	AASLLAS	155	QSASYSTGPDWT
MAB-15-0108	MAB-16-0028	122	QASQSIYIYLS	139	DASKLAS	156	QQGATTYNVDNV
MAB-15-0110	MAB-16-0031	123	QASENIGNGLA	140	GASTLAS	157	QCTYWNPDIYIGGA
MAB-15-0117	MAB-16-0043	124	LASEDIYSGIS	141	AASNLES	158	LGGYSYSNTGPT
MAB-15-0121	MAB-16-0049	125	QASEDIYSNLA	142	GASTLAS	159	LGVCTDISTDDLINA
MAB-15-0140	MAB-16-0045	126	QASEDIYSNLA	143	RASTLAS	160	LGVYTYSTDIHA
MAB-15-0115	MAB-16-0040	127	QASEDIYSNLA	144	DASTLAS	161	LGVYTHISADNA
MAB-15-0125	MAB-16-0036	128	QASENIYSSLA	145	DASDLAS	162	QQGYSSGGTDNDV
MAB-15-0119	MAB-16-0046	129	QSSQSVDGNN LLS	146	DASNLAS	163	QGSYSSSWYINV
MAB-15-0109	MAB-16-0030	130	QASQSIYSFLS	147	AASDLES	164	QCNYIIDYGA
MAB-15-0097	MAB-16-0021	131	QASQSIGYYLA	148	RASTLAS	165	QSYNSDSDA

MAB-15-0135	MAB-16-0019	132	QASQTISINLA	149	YASTLAS	166	QGGYTEDNIDNT
MAB-15-0133	MAB-16-0015	133	QASQNIYSNLA	150	AASLLAS	167	QGAVYSGNTEWA
MAB-15-0107	MAB-16-0027	134	QASQSVYNSN HLS	151	SASTLAS	168	QGEFSCVSADCIA
MAB-15-0128	MAB-16-0048	135	QASQSISSYLS	152	GASNLAS	169	QCTYYDNNYGGA
MAB-15-0116	MAB-16-0041	136	QASESISANYW S	153	GASTLAS	170	QSWYYSGSGSYHWSA

SEQ ID NO.	Последовательности константных областей (CR)
171	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
172	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

Название mAb	SEQ ID NO.	Полная последовательность VR тяжелой цепи
MAB-16-0150	173	EVQLLESGGRLVQPGTSLRLSCAVSGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEIVGVITSSATTYYAS WAKGRFTISKTSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYFCARGGPGYSTNTHYAFDPWGGQTLVT VSS

Название mAb	SEQ ID NO.	Полная последовательность VR легкой цепи
MAB-16-0149	174	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSIYFSLWYQQKPGQAPKLLIYAASDLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSNYIIDYGAFGGQGTKVVIK
		<b>CDR-L3</b>
MAB-16-0149	175	QSNYIIDYGA

Название mAb	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	VH	VL
	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.
<b>MAV-16-0150</b>	71	88	105	122	139	156	173	54
<b>MAV-16-0149</b>	79	96	113	130	147	175	28	174

**ФИГ. 2** ELISA человеческих IL-1R3

ИД антитела	huIL1RaP ELISA EC50 [нг/мл]
MAV-16-0015	1,6
MAV-16-0019	28,1
MAV-16-0021	20,8
MAV-16-0004	8,0
MAV-16-0009	4,9
MAV-16-0027	5,3
MAV-16-0030	4,5
MAV-16-0040	6,6
MAV-16-0043	13,2
MAV-16-0046	7,4
MAV-16-0049	20,6
MAV-16-0028	6,0
MAV-16-0031	8,2
MAV-16-0041	15,2
MAV-16-0036	5,9
MAV-16-0045	28,4
MAV-16-0048	7,4
эталонное AF676	79,6

**ФИГ. 3** Анализ репортера HEK293

ИД антитела	Репортерный анализ HEK (IL1b) EC50 [нг/мл]
MAV-16-0015	27,3
MAV-16-0019	2,5
MAV-16-0021	33,0
MAV-16-0004	67,1
MAV-16-0009	18,2
MAV-16-0027	37,3
MAV-16-0030	8,7

MAV-16-0040	9,4
MAV-16-0043	27,0
MAV-16-0046	6,1
MAV-16-0049	42,6
MAV-16-0028	5,1
MAV-16-0031	23,3
MAV-16-0041	0,1
MAV-16-0036	9,5
MAV-16-0045	90,2
MAV-16-0048	16,3
эталонное AF676	234

**ФИГ. 4** Анализ гена-репортера NFκB люциферазы в стабильной клеточной линии A549

ИД антитела	NFκB A549 (IL-1b) (Signosis) EC50 [нг/мл]
MAV-16-0015	+
MAV-16-0019	++
MAV-16-0021	+
MAV-16-0004	++
MAV-16-0009	+++
MAV-16-0027	++
MAV-16-0030	+++
MAV-16-0040	+
MAV-16-0043	+
MAV-16-0046	+++
MAV-16-0049	+
MAV-16-0028	+++
MAV-16-0031	+
MAV-16-0041	+
MAV-16-0036	+++
MAV-16-0045	+
MAV-16-0048	+
эталонное AF676	+

**ФИГ. 5** Анализ связывания клеток: связывание с IL-1R3-экспрессирующими клетками

	NIH-3T3	A549	HEK-293	SK-MEL-30
Антитело	MFI (среднее значение интенсивности флуоресценции)- кратное увеличение относительно изотипного контроля			
MAV-16-0019	1,2	2,7	3,6	79,0
MAV-16-0030	0,9	2,4	2,8	69,7



MAV-16-0040	1,0	2,6	3,0	73,7
MAV-16-0036	1,1	2,0	3,0	70,6
MAV-16-0149	1,1	2,4	3,4	77,7
MAV-16-0150	1,1	3,2	4,8	87,1

**ФИГ. 6** Анализ связывания клеток: связывание клеток в клеточной линии SK-MEL-30 с высоким уровнем экспрессии человеческих IL-1R3

Антитело	EC50 (нг/мл)
MAV-16-0030	307
MAV-16-0149	306

**ФИГ. 7** Биохимический ELISA анализ человеческого IL-1R3

Антитело	EC50 (нг/мл)
MAV-16-0149	16,3
MAV-16-0150	29,1

**ФИГ. 8**

Подавление опосредованной IL-1a и IL-1b сигнализации NFκB в клетках A549-NFκB-RE-Luc

	Стимулированные hIL-1a	Стимулированные hIL-1b
Антитело	EC50 (нг/мл)	EC50 (нг/мл)
MAV-16-0019	56	140
MAV-16-0030	156	149
MAV-16-0040	969	636
MAV-16-0036	199	25
MAV-16-0149	167	109
MAV-16-0150	211	11
AF676	3134	919

**ФИГ. 9** Анализ функциональной нейтрализации IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ : подавление опосредованного IL- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  высвобождения IL-6 клетками A-549

	Стимулированные hIL-1 $\alpha$	Стимулированные hIL-1 $\beta$
Антитело	ЕС50 (нг/мл)	ЕС50 (нг/мл)
МАВ-16-0019	546	180
МАВ-16-0030	361	346
МАВ-16-0040	2246	234
МАВ-16-0036	378	253
МАВ-16-0149	266	108
МАВ-16-0150	1464	313
AF676	>10000	>10000

**ФИГ. 10** Анализ функциональной нейтрализации IL-33: подавление опосредованной IL-33 сигнализации NF $\kappa$ B в клетках HEK-Blue-IL33™

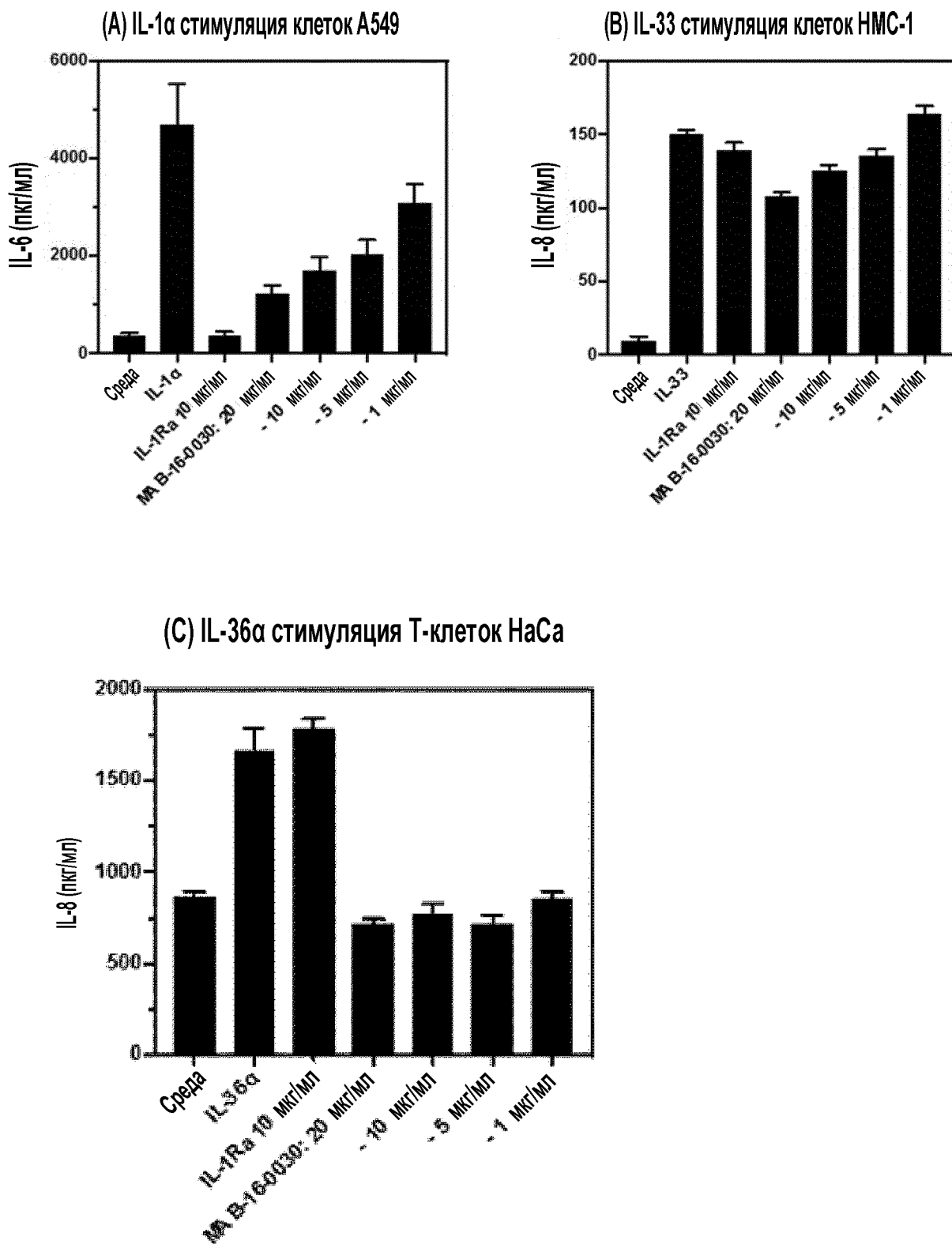
	Стимулированные hIL-33
Антитело	ЕС50 (нг/мл)
МАВ-16-0019	376
МАВ-16-0030	909
МАВ-16-0040	17195
МАВ-16-0036	426
МАВ-16-0149	432
МАВ-16-0150	2115
AF676	26114

**ФИГ. 11** Анализ функциональной нейтрализации IL-36: Подавление опосредованной IL-36 сигнализации NFκB в клетках HEK-293/17-IF

	Стимулированные hIL-36
Антитело	EC50 (нг/мл)
MAV-16-0019	11
MAV-16-0030	13
MAV-16-0040	42
MAV-16-0036	14
MAV-16-0149	18
MAV-16-0150	13
AF676	502

## ФИГ. 12

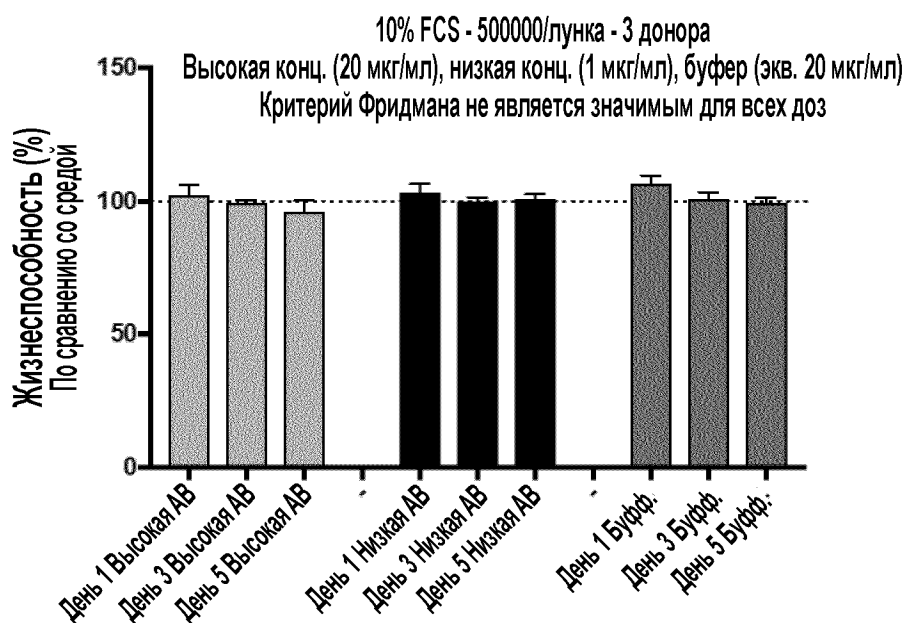
Нейтрализация IL-1a, IL-33 и IL-36a - нейтрализация опосредованного IL-1a, IL-33 и IL-36a выделения клеточных цитокинов, обусловленная IL-1Ra и МАВ-16-0030



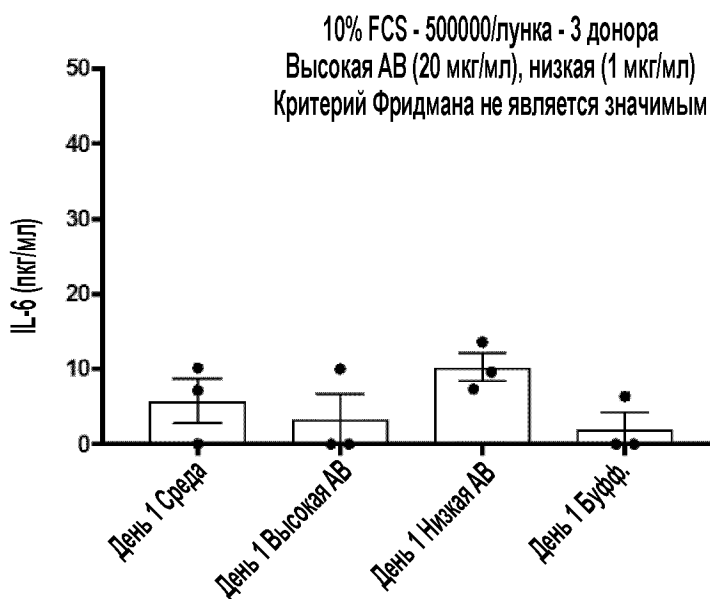
## ФИГ. 13

Жизнеспособность и высвобождение IL-6 нестимулированными РВМС, обработанными гуманизированным анти-IL-1R3 IgG1-LALA антителом MAB-16-0030

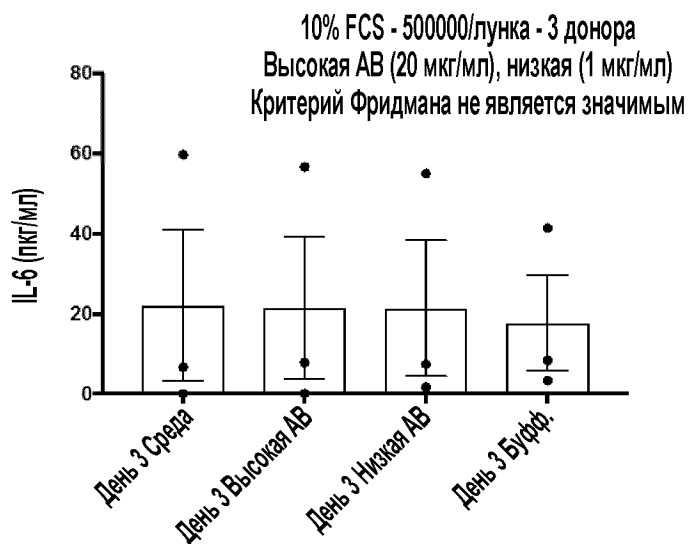
## Жизнеспособность РВМС без стимулов, используя MAB-16-0030



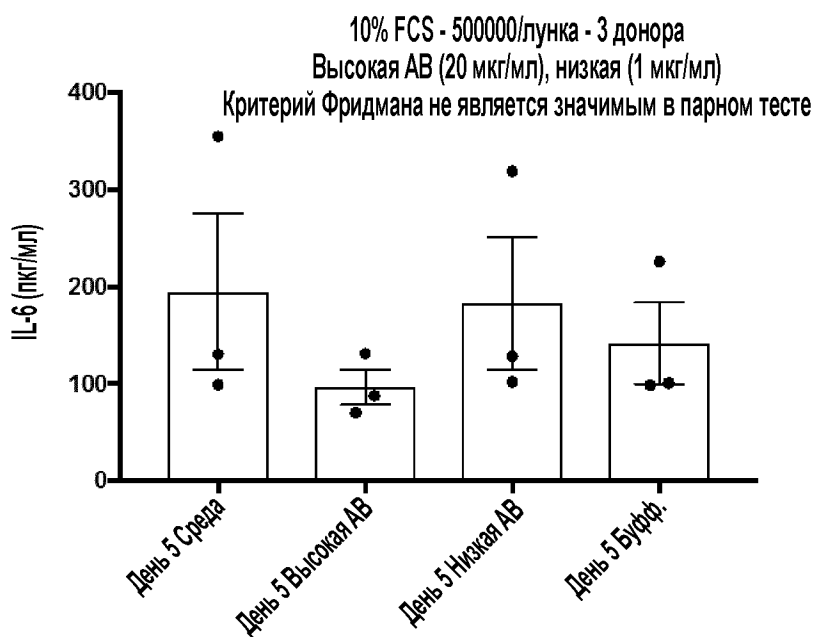
## Продукция IL-6 в РВМС без стимула (день 1)



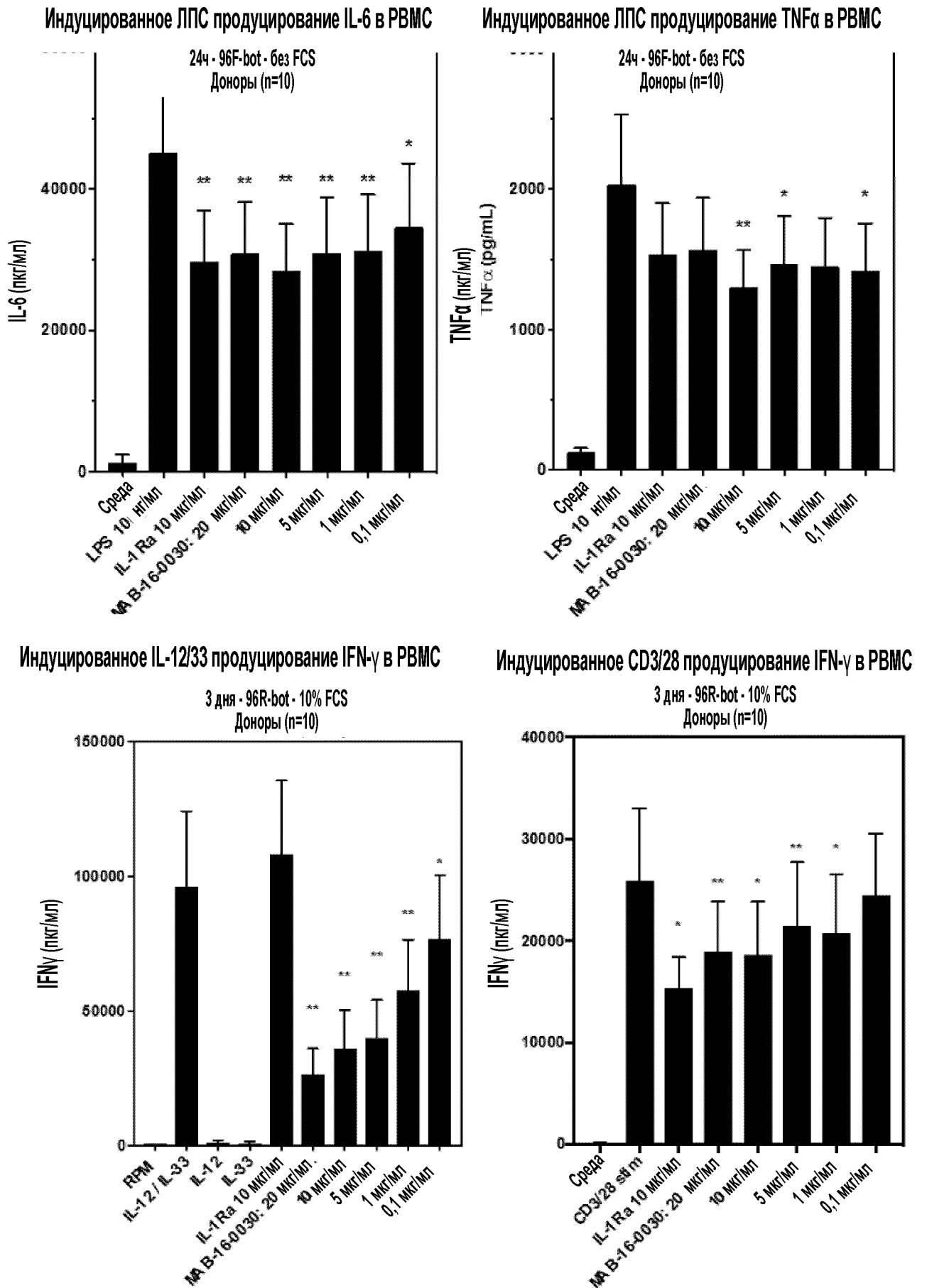
## Продукция IL-6 в РВМС без стимула (день 3)



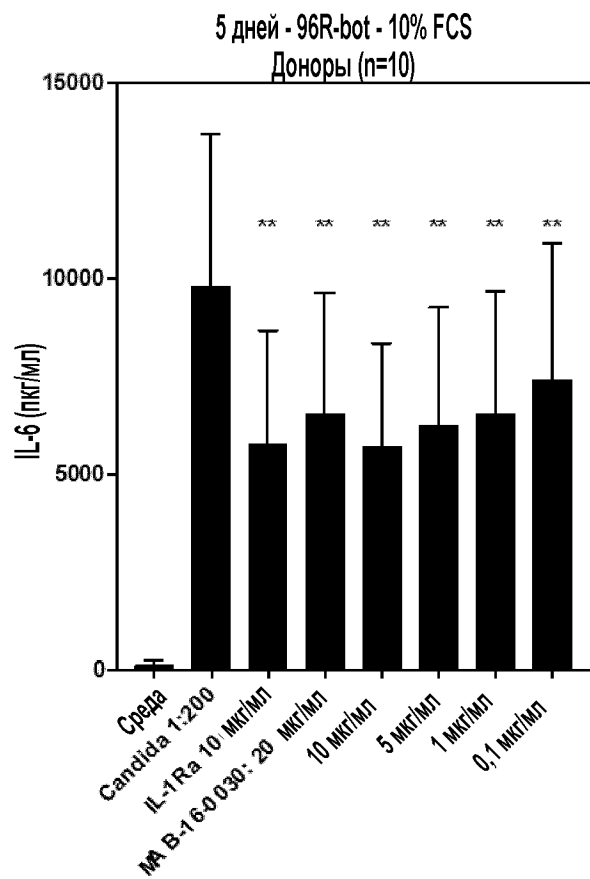
## Продукция IL-6 в РВМС без стимула (день 5)



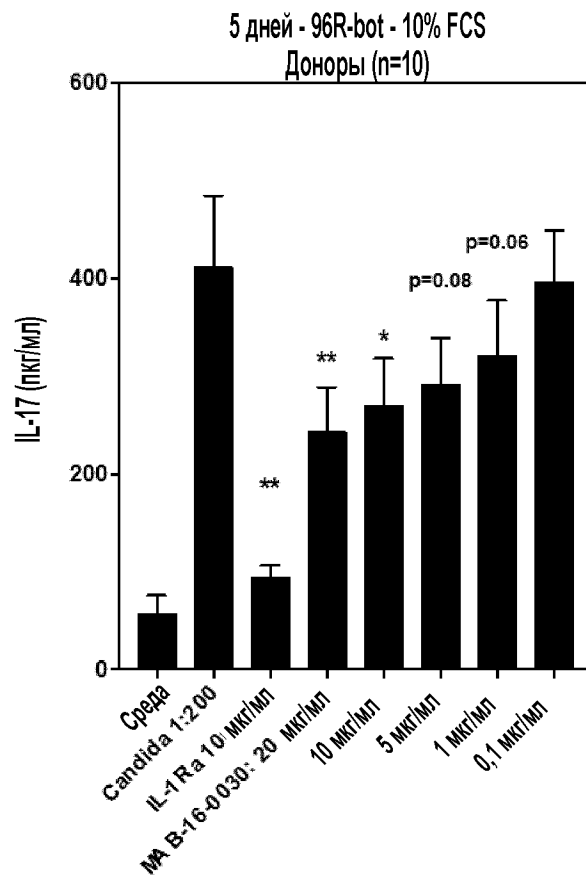
**ФИГ. 14** Функциональное блокирование РВМС, активированных различными раздражителями



### Индукцированное Candida продуцирование IL-6 в PBMC



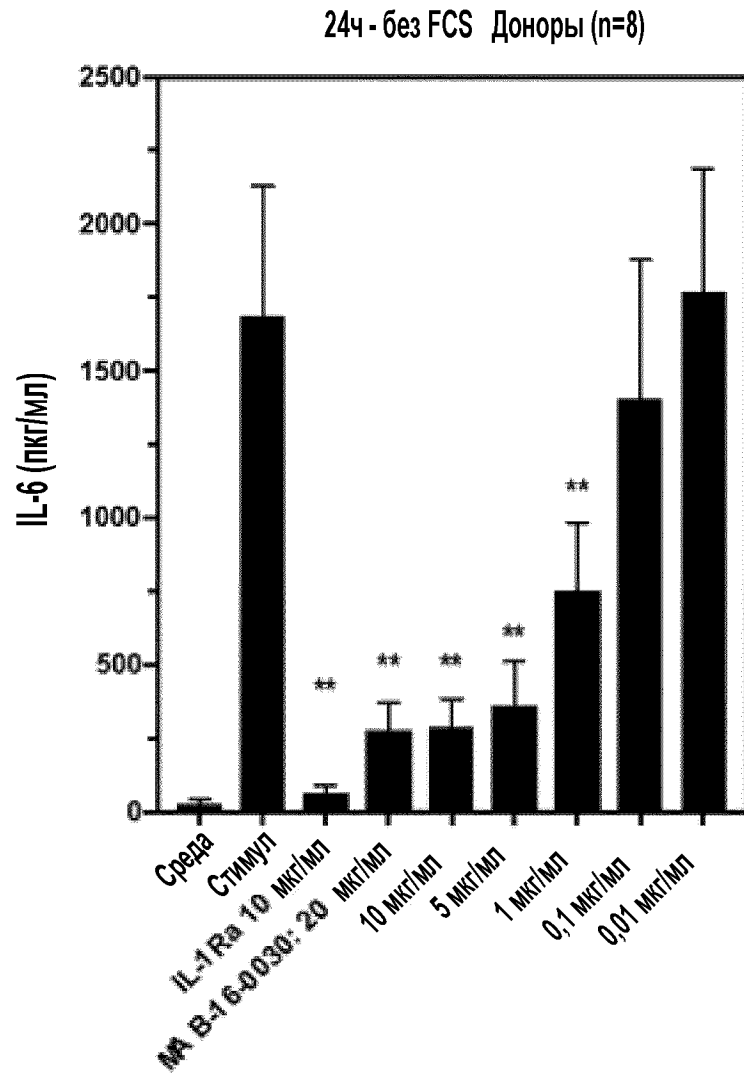
### Индукцированное Candida продуцирование IL-17 в PBMC





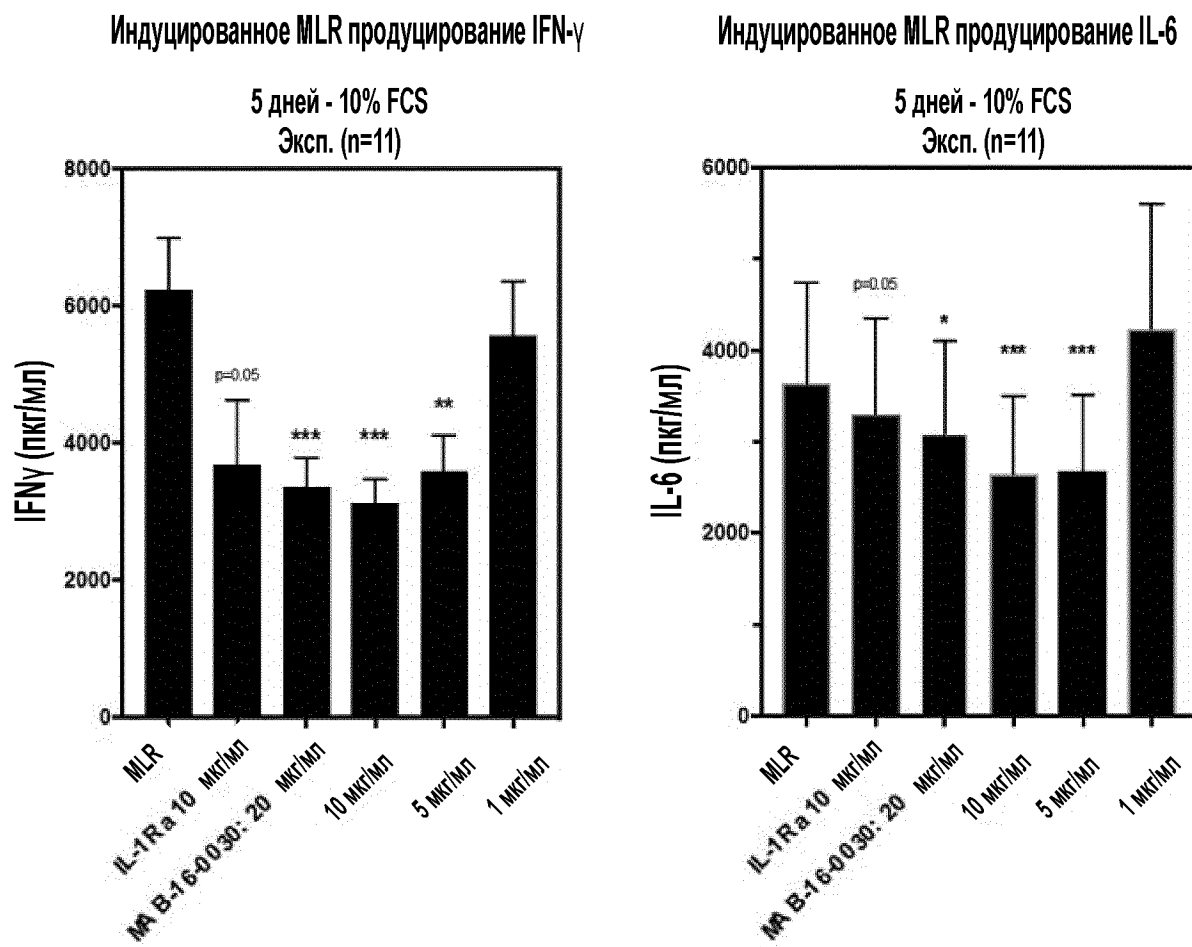
## ФИГ. 15

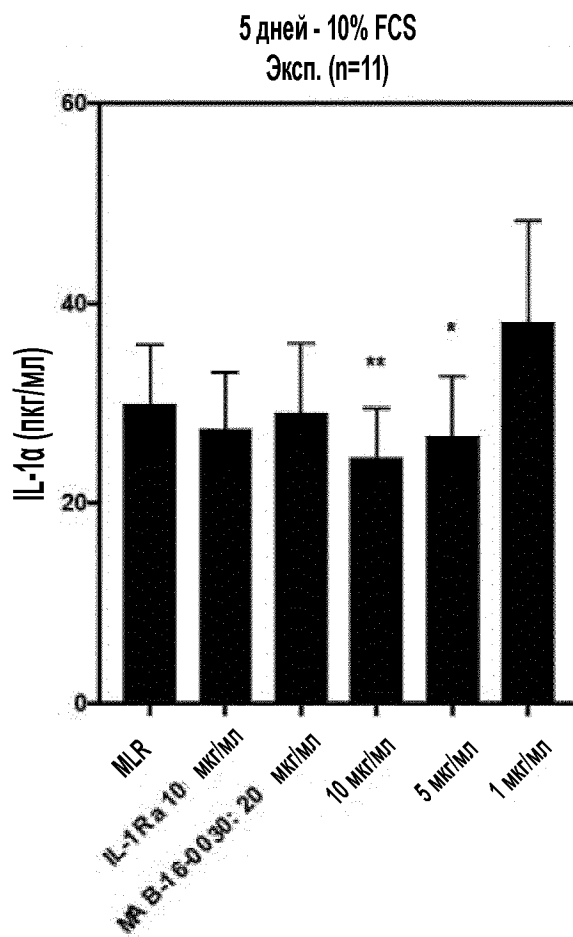
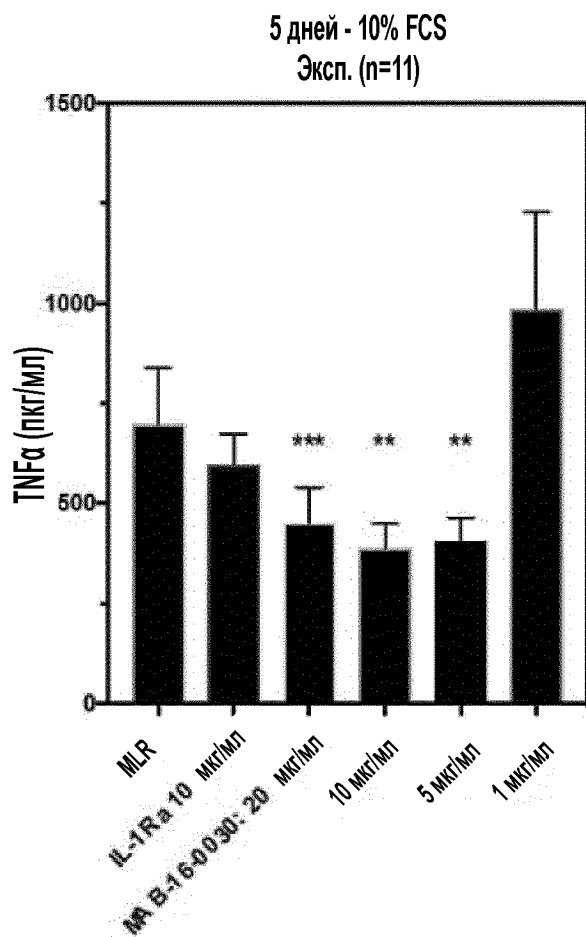
Функциональное блокирование иммунных клеток в цельной крови, активированной *Candida albicans*

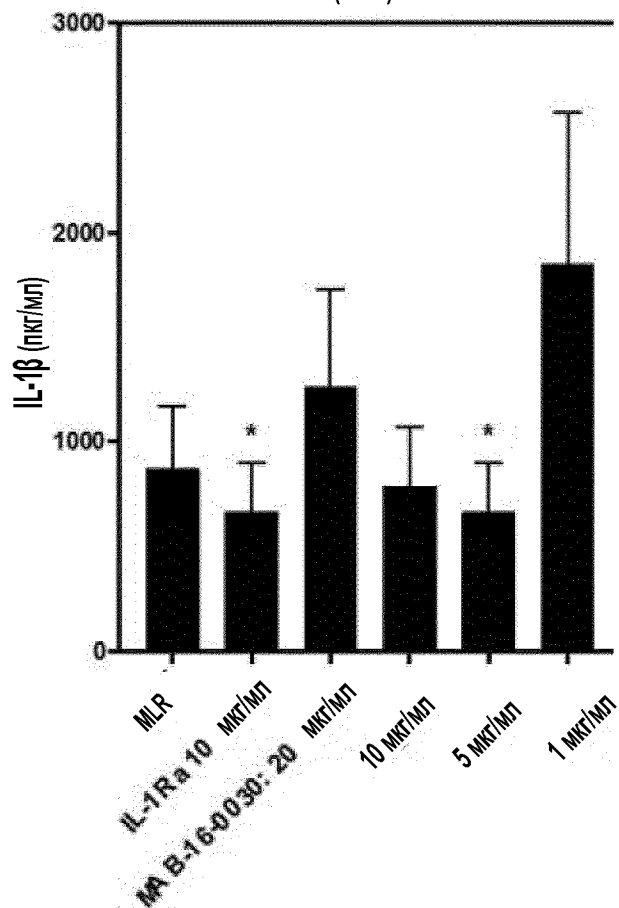


ФИГ. 16

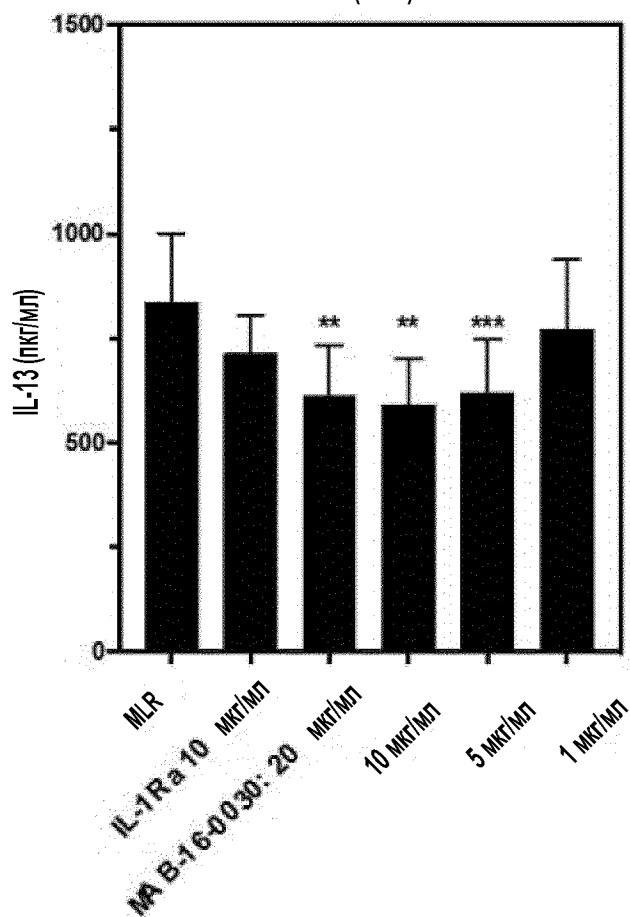
Блокирование высвобождения цитокинов в реакциях смешанных лимфоцитов (MLR)



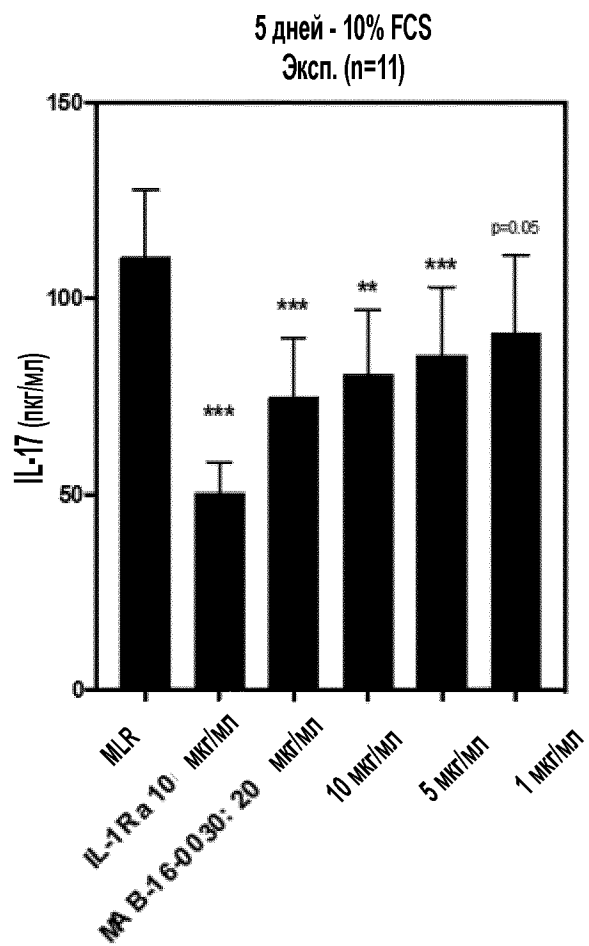
Индукционное MLR продуцирование TNF $\alpha$ Индукционное MLR продуцирование IL-1 $\alpha$ 

Индукционное MLR продуцирование IL-1 $\beta$ 5 дней - 10% FCS  
Эксп. (n=11)

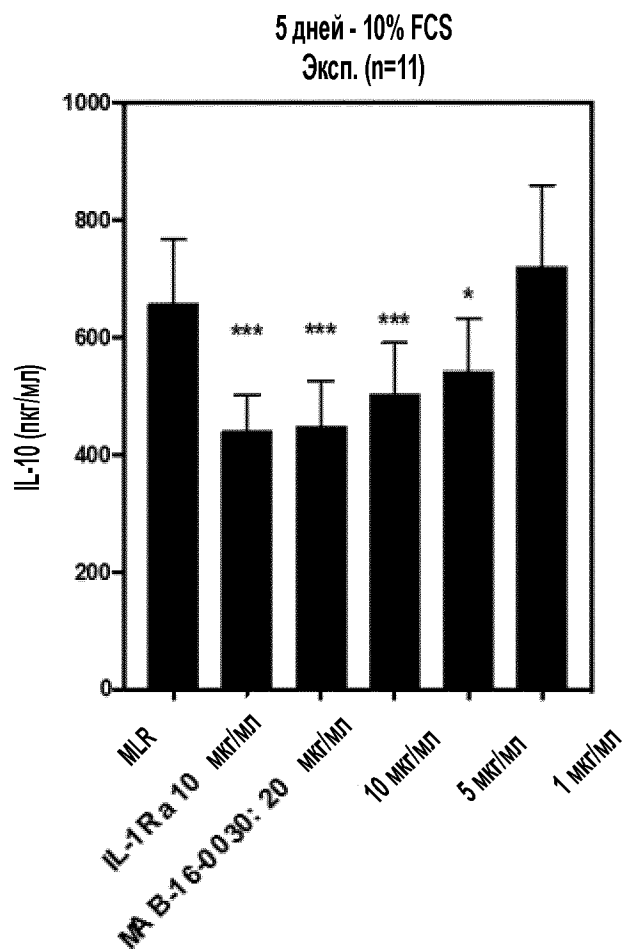
## Индукционное MLR продуцирование IL-13

5 дней - 10% FCS  
Эксп. (n=11)

## Индукцированное MLR продуцирование IL-17



## Индукцированное MLR продуцирование IL-10



**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference B198-0007WO1	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/EP2017/060925	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 8 May 2017 (08-05-2017)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 6 May 2016 (06-05-2016)	
Applicant  MAB DISCOVERY GMBH			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2017/060925

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present disclosure relates to humanized antibodies that specifically bind to IL-1R3 or a fragment or derivative thereof or a polypeptide that contains at least a portion of said antibody that is sufficient to confer IL-1R3 binding specificity. Said antibodies inhibit IL-1R3 induced NFkB activity. They also inhibit IL-1alpha, IL-1beta, IL-33, and/or IL-36 stimulated NFkB activity. The disclosure further relates to use of said humanized antibody in the treatment of an IL-1R3 mediated disease such as cancer.

The disclosure finally encompasses a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a therapeutically effective amount of the antibody according to the invention. The pharmaceutical composition can be used in treating a IL-1R3 mediated disease such as cancer.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/060925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K16/28  
ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/132602 A1 (CANTARGIA AB [SE]) 11 September 2015 (2015-09-11) See claims, Figure 3 -----	1-19
X	WO 2012/098407 A1 (CANTARGIA AB [SE]; SMITH STEPHEN EDWARD [GB]; FIORETOS THOAS [SE]; JAE) 26 July 2012 (2012-07-26) See example 6, Table 1, claims -----	1-19
A	WO 2012/177595 A1 (ONCOFACTOR CORP [US]; WARREN SARAH ELLEN [US]; WEISSMAN CARL [US]) 27 December 2012 (2012-12-27) See claims -----	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 June 2017

Date of mailing of the international search report  
04/07/2017

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer  
Nauche, Stéphane

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/060925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015132602 A1	11-09-2015	AU 2015225948 A1	08-09-2016
		CA 2941437 A1	11-09-2015
		CN 106459195 A	22-02-2017
		EP 3114145 A1	11-01-2017
		KR 20160127131 A	02-11-2016
		SG 11201607322P A	28-10-2016
		US 2017029516 A1	02-02-2017
		WO 2015132602 A1	11-09-2015
		-----	
WO 2012098407 A1	26-07-2012	AU 2012208379 B2	20-04-2017
		CA 2824719 A1	26-07-2012
		CN 103459424 A	18-12-2013
		DK 2665749 T3	21-03-2016
		EP 2665749 A1	27-11-2013
		EP 3020730 A1	18-05-2016
		ES 2566538 T3	13-04-2016
		JP 5940093 B2	29-06-2016
		JP 2014511348 A	15-05-2014
		KR 20140003550 A	09-01-2014
		RU 2013138439 A	27-02-2015
		US 2014017167 A1	16-01-2014
		US 2017081414 A1	23-03-2017
		WO 2012098407 A1	26-07-2012
-----			
WO 2012177595 A1	27-12-2012	AU 2012273153 A1	02-05-2013
		CA 2837651 A1	27-12-2012
		CN 103608030 A	26-02-2014
		EP 2723365 A1	30-04-2014
		JP 2014527398 A	16-10-2014
		US 2015030586 A1	29-01-2015
		WO 2012177595 A1	27-12-2012
-----			